

Aus dem Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel  
Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung des Max Rubner-Institut  
(Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Schrezenmeir)

**UNTERSUCHUNG ZUR GENVARIANZ  
CARNITINABHÄNGIGER TRANSPORTPROTEINE IN  
EINER POPULATIONSBASIERTEN KOHORTE**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**MARTIN M. I. SABANDAL**

aus Bonn

Kiel (2009)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Schrezenmeir  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Krawczak  
Tag der mündlichen Prüfung: 31. August 2009  
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 31. August 2009  
gez. Prof. Dr. Rose-John (Vorsitzender der Prüfungskommission)

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das metabolische Syndrom .....	1
1.1.1	Pathophysiologie des metabolischen Syndroms .....	1
1.2	Die Funktion und Lage von CPT 1, CACT und CPT 2 im Lipidstoffwechsel.....	2
1.3	Aufgabenstellung .....	5
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>6</b>
2.1	Methoden .....	6
2.1.1	Probandenrekrutierung und Beschreibung der Kohorte .....	6
2.1.1.1	Ein- und Ausschlußkriterien für die Studie .....	6
2.1.1.2	oGTT .....	7
2.1.1.3	oMTT.....	7
2.1.1.4	Auswahl der CPT SNP .....	7
2.1.2	Laborarbeiten .....	8
2.1.2.1	DNA-Gewinnung .....	8
2.1.2.2	Amplifikation des CACT-Gens .....	9
2.1.2.3	Primerdesign für das CACT-Gen.....	10
2.1.2.4	Sequenzierung der DNA-Fragmente.....	11
2.1.2.5	Genotypisierung des CACT-Gens .....	11
2.1.2.6	Genotypisierung der CPT-Gene und Beschreibung der TaqMan-Methode .....	12
2.1.2.7	Statistische Analyse der genotypisierten Sequenzen.....	12
2.2	Material.....	13
2.2.1	Verbrauchsmaterial .....	13
2.2.2	Geräte .....	14
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>15</b>
3.1	Ergebnisse für CACT .....	15
3.1.1	Ergebnis Exon 1.....	15
3.1.2	Ergebnis Exon 2.....	15
3.1.3	Ergebnis Exon 3.....	16
3.1.4	Ergebnis Exon 4.....	16
3.1.5	Ergebnis Exon 5.....	16
3.1.6	Ergebnis Exon 6.....	17
3.1.7	Ergebnis Exon 7.....	17
3.1.8	Ergebnis Exon 8.....	17
3.1.9	Ergebnis Exon 9.....	17

3.2	Ergebnisse für die CPT 1b SNP .....	18
3.3	Ergebnisse für den CPT 2 SNP .....	21
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>23</b>
4.1	Folgen einer Unterfunktion von CACT, CPT 1 oder CPT 2 .....	23
4.2	Beschriebene genetische Defekte von CACT in der Literatur .....	24
4.3	Beurteilung der Ergebnisse für CACT .....	26
4.4	Beurteilung der Ergebnisse der untersuchten CPT-Polymorphismen .....	28
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>39</b>
7.1	Tabellen .....	39
7.2	Danksagung .....	42
7.2	Lebenslauf .....	43

## Abkürzungsverzeichnis

A	Purinbase Adenin
Acetyl-CoA	aktivierte Essigsäure
Acyl-CoA	Acyl-Coenzym A
BMI	Body Mass Index
C	Pyrimidinbase Cytosin
CACT	Carnitin-Acylcarnitin-Translocase
cDNA	core (Kern) Desoxyribonukleinsäure
CoA	Coenzym A
CPT 1	Carnitin-Palmitoyltransferase 1
CPT 2	Carnitin-Palmitoyltransferase 2
CRP	c-reaktives Protein
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Purinbase Guanin
GGT	gamma-Glutamyl-Transpeptidase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
H <sub>2</sub> O reinst	Wasser bidest.
HDL	High density lipoprotein
LDL	Low density lipoprotein
MCH	mittleres corpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere corpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres corpuskuläres Volumen
oGTT	oraler Glucose Toleranztest
oMTT	oraler metabolischer Toleranztest
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RR	Messung des Blutdruckes nach Riva Rocci
SNP	single nucleotide polymorphism (Punktmutation)
T	Pyrimidinbase Thymin
VLDL	very low density lipoprotein
WHR	Waist to Hip Ratio (Verhältnis Taille zu Hüfte)
6-FAM	Fluoreszenzfarbstoff ((3',6'-Dipivaloylfluoresceinyl)-6-carboxidohexyl)-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit)

# 1 Einleitung

## 1.1 Das metabolische Syndrom

In den Industriegesellschaften gewinnt die Diagnose „Übergewicht“ zunehmend an Bedeutung. Insbesondere mit einer erhöhten abdominalen Fettmasse vergesellschaftet sind erhöhte Triglyzeride und ein erniedrigtes High Density Lipoprotein (HDL)-Cholesterin, Insulinresistenz sowie ein erhöhter Blutdruck. Diese Befunde werden unter dem Metabolischen Syndrom zusammengefasst. Nach den Kriterien des National Cholesterol Education Program (NCEP), Adult Treatment Panel (ATP) III der USA (2001) liegt dieses vor, wenn mindestens drei der folgenden Kriterien erfüllt werden [Eckel et al. 2005]:

- Taillenumfang bei Männern  $> 102$  cm und bei Frauen  $> 88$  cm
- Triglyzeride  $\geq 150$  mg/dl
- HDL bei Männern  $< 40$  und bei Frauen  $< 50$  mg/dl
- Blutdruck  $\geq 130/85$  mm Hg
- Nüchternnglucose  $\geq 110$  mg/dl

### 1.1.1 Pathophysiologie des metabolischen Syndroms

Die zentrale pathophysiologische Veränderung des metabolischen Syndroms ist die Insulinresistenz. Ein entscheidender Faktor bei der Entwicklung der Insulinresistenz ist ein Überangebot an zirkulierenden Fettsäuren. An Plasmaalbumin gebundene freie Fettsäuren, werden durch eine cAMP abhängige hormonsensitive Lipase im Fettgewebe freigesetzt. Freie Fettsäuren werden ebenfalls per Lipolyse durch die Reaktion von Lipoproteinlipasen aus triglyzeridreichen Lipoproteinen in den Geweben freigesetzt. Insulin wirkt sowohl antilipolytisch als auch stimulierend auf die Lipoproteinlipase. Entsteht eine Insulinresistenz, folgt daraus eine erhöhte Freisetzung von freien Fettsäuren, die weiter den inhibitorischen Effekt des Insulins vermindern und so zu einer zusätzlichen Lipolyse führen [Eckel et al. 2005]. Die Aufnahme von energiereicher und hochfetthaltiger Nahrung ist eng mit Übergewicht assoziiert, in diesem Zusammenhang vor allem mit einer verstärkten Ansammlung von abdominellem Fettgewebe [Ricardi et al. 2004]. Dieses verschlechtert die Insulinsensitivität und führt dazu, daß sich im Zuge eines Circulus Vitiosus bei verschlechterter Insulinsensitivität auch die Konzentration an Low Density Lipoprotein

(LDL) im Blut erhöht, wodurch wiederum die Sensitivität nachlässt [Reaven 1995]. Patienten mit erhöhtem Blutdruck weisen in der Regel auch eine Insulinresistenz auf, dies lässt den Schluß zu, daß eine Insulinresistenz zu einer Hypertonie führt, welche im weiteren Verlauf auch kardiovaskuläre Veränderungen mit sich bringen kann [Reaven 1995].

## 1.2 Die Funktion und Lage von CPT 1, CACT und CPT 2 im Lipidstoffwechsel

Die Energiegewinnung aus Triglyzeriden spielt für den menschlichen Körper eine wichtige Rolle, da der Energiegehalt der Triglyzeride ( $9,3 \text{ kcalg}^{-1}$ ) 2-fach höher ist als der der Kohlenhydrate ( $4,1 \text{ kcalg}^{-1}$ ) [IJlst et al. 2001, Chalmers et al. 1997, Löffler, Petrides 1998].

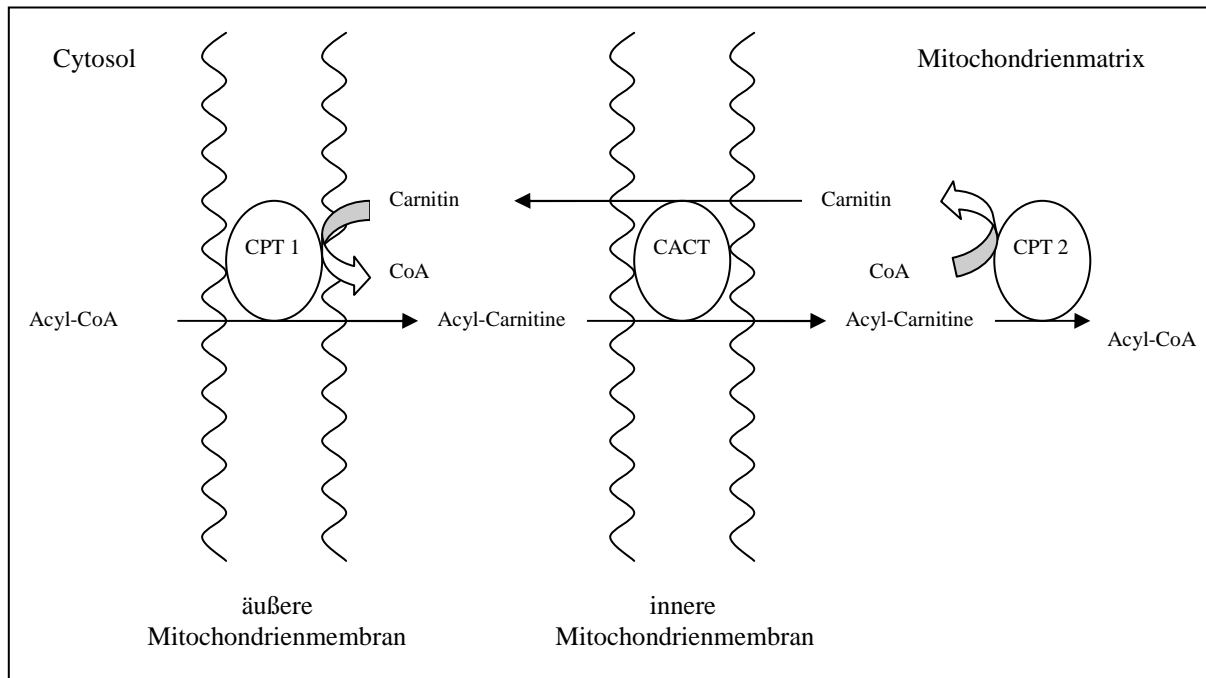
Die Energiegewinnung aus Triglyzeriden erfolgt durch  $\beta$ -Oxidation [IJlst et al. 2001]. Hierzu werden die Lipide durch eine Lipase in mehreren Schritten in Glycerin und die entsprechenden Fettsäuren aufgespalten [Löffler, Petrides 1998]. Die langkettigen Fettsäuren werden dann durch Kopplung an Coenzym A (CoA) zu Acyl-CoA aktiviert und in die Matrix der Mitochondrien transportiert, da die zur  $\beta$ -Oxidation notwendigen Enzyme nur dort lokalisiert sind [IJlst et al. 2001]. Für den carnitinabhängigen Transportvorgang der langkettigen Fettsäuren, sind drei Transportproteine notwendig, die in der Mitochondrienmembran bzw. in der Mitochondrienmatrix zu finden sind [IJlst et al. 2001, Palmieri 2004]. Der Transport der aktivierten Fettsäuren in die Mitochondrienmatrix erfolgt in drei Schritten.

Da aktivierte Fettsäuren (=Acyl-CoA) die Mitochondrienmembran nicht direkt passieren können wird dies durch das Transportprotein Carnitin-Palmitoyl-Transferase I (CPT I), lokalisiert in der äußeren Mitochondrienmembran, ermöglicht. Dieses Enzym bewirkt durch Kopplung von L-Carnitin an den Thioester eine Umesterung des Acyl-CoA zu Acyl-Carnitin, wobei CoA freigesetzt wird [IJlst et al. 2001].

Das entstandene Acyl-Carnitin wird im Austausch gegen freies Carnitin durch einen entsprechenden Carrier, der Carnitin-Acylcarnitin-Translocase (CACT) in die Mitochondrienmatrix transportiert [IJlst et al. 2001, Palmieri 2004]. CACT ist ein elektrisch neutrales Transportprotein, welches ubiquitär in den Mitochondrien des Organismus vorkommt. Der Carrier ist ein Antiport. Dies bedeutet, daß bei jedem Transportvorgang ein Substrat/Metabolit gegen ein anderes, in diesem Fall Acyl-Carnitin gegen freies Carnitin,

ausgetauscht wird. Bei diesem Austausch gelangt das freie Carnitin in das Cytosol und das Acyl-Carnitin in die Mitochondrienmatrix [IJl et al. 2001, Palmieri 2004].

In der Mitochondrienmatrix wird das Acyl-Carnitin wiederum in Acyl-CoA umgewandelt. Dies geschieht durch das Enzym Carnitin-Palmitoyl-Transferase 2 (CPT 2). Bei dieser Reaktion wird der Fettsäurerest auf vorhandenes CoA übertragen und Carnitin freigesetzt [IJl et al. 2001, Palmieri 2004].



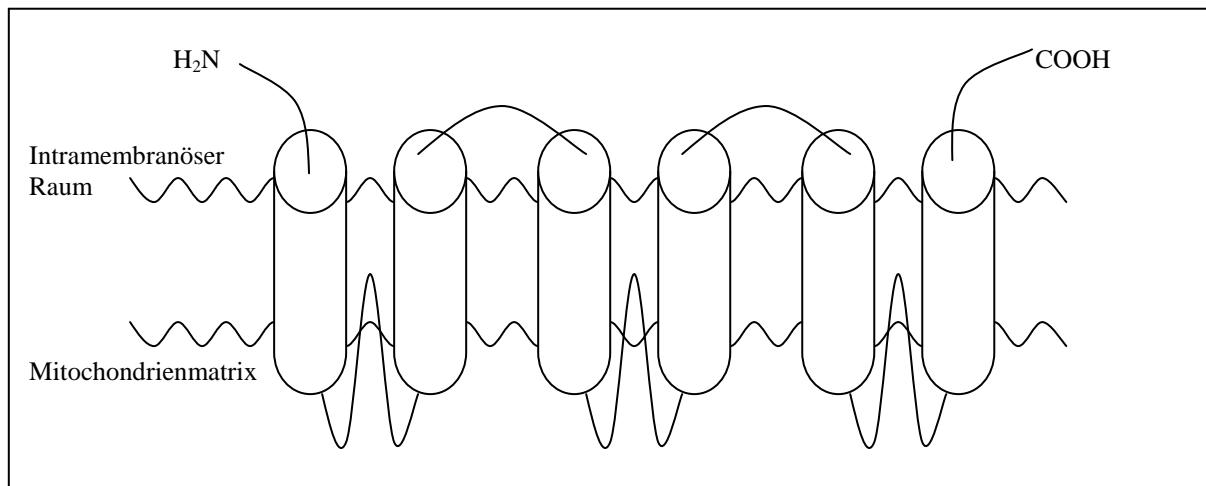
**Abbildung 1 Transport des Acyl-CoA in die Mitochondrienmatrix**

CACT gehört zu der solute carrier family 25 (SLC25). Der Proteinfamilie gehören Carrier an, deren Funktion im Transport einer Vielzahl von Metaboliten besteht. Die zu transportierenden Metabolite sind an Reaktionen wie der oxidativen Phosphorylierung, dem Zitronensäurezyklus, der Fettsäureoxidation, der Glukoneogenese, der Lipogenese, dem Transfer von Reduktionsäquivalenten, der Harnstoffsynthese, des Aminosäureabbaus und an der intramitochondrialen DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese beteiligt. Es liegen funktionelle und genetische Studien vor, die das Vorhandensein von 37 Carriern dieser Familie untersuchen bzw. beschreiben [Palmieri 2004, Haitina et al. 2006]. Die Carrier dieser Proteinfamilie sind sowohl funktionell als auch strukturell eng miteinander verwandt, alle Proteine der Familie weisen 6  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen auf und sind, bis auf eine Ausnahme, in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Diese Transportproteine stellen eine unentbehrliche Verbindung zwischen Cytosol und der Mitochondrienmatrix dar, jedoch benötigen sie die Mitwirkung verschiedener intra- und/oder extramitochondrialer



Enzymreaktionen [Palmieri 2004]. Die SLC25-Familie kann in elektroneutrale und in potentialgesteuerte Carrier eingeteilt werden [Palmieri 2004].

CACT wird durch 9 Exone kodiert, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 liegen (3p21.31). Die 9 Exone kodieren 6 Transmembrandomänen ( $\alpha$ -Helices) mit 3 extramembran liegenden hydrophilen Loops, die die Transmembrandomänen miteinander verbinden. Das CACT-Gen erstreckt sich über eine Länge von 16,5 Kb genomischer DNA. Die cDNA weist eine Länge von insgesamt 1243 Bp auf [Iacobazzi 1998, Huizing 1997]. Neben dem zur  $\beta$ -Oxidation essentiellen CACT-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 ein Pseudogen (CACTp) (6p12). Das Pseudogen erstreckt sich über eine Länge von 2150 Bp genomischer DNA, erfüllt jedoch keine Funktion und kodiert im Gegensatz zu CACT kein Enzym.



**Abbildung 2 Schematische Zeichnung der SLC25 Carrier modifiziert nach Palmieri 2004**

CPT 1 ist ein für den Lipidstoffwechsel essentielles Protein, welches in der dem Cytosol zugewandten Mitochondrienmembran liegt. Vom CPT 1-Protein existieren 3 verschiedene Isoformen [Hirota 2007], die auch in verschiedenen Geweben vorkommen. Die CPT 1a Isoform kommt in der Leber vor. Das entsprechende Gen liegt auf Chromosom 11 (11q13.1-q13.2). Die CPT 1b Isoform kommt im Muskelgewebe, dem Herzen aber auch im Fettgewebe und den Hoden vor, das dazu gehörige Gen liegt auf Chromosom 22 (22q13.33) [Robitaille 2007]. Die CPT 1c Isoform kommt im Gehirn vor [Hirota 2007]. CPT 1 erfüllt im Zuge der  $\beta$ -Oxidation dahingehend eine wichtige Funktion, als daß das Protein die CoA-Gruppe des Acyl-CoA durch Carnitin substituiert. Diese Substitution ist zum Transfer des Fettsäurerestes in das Mitochondrium zur  $\beta$ -Oxidation essentiell. Findet die Reaktion nicht statt, können nur Fettsäuren mit weniger als 12 Kohlenstoffatomen die Mitochondrienmembran passieren

[Brivet 1999, Rubio-Gozalbo 2003]. In der Mitochondrienmatrix wird durch CPT 2 Carnitin erneut durch CoA substituiert, somit liegt der Acylrest erneut als aktivierte Fettsäure vor und kann durch  $\beta$ -Oxidation unter Energiegewinn aufgespalten werden.

### **1.3 Aufgabenstellung**

Unter dem Aspekt, daß CPT 1, CACT und CPT 2 für den Lipidstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen, ergibt sich die Frage, ob es eine Assoziation zwischen Genvarianten dieser drei Proteine des Lipidstoffwechsels und den Parametern des Metabolischen Syndroms gibt.

Zum momentanen Zeitpunkt existiert unserem Wissen nach keine Studie, die sich mit einer Assoziation zwischen Polymorphismen der CACT-, CPT 1- und CPT 2-Gene und dem Metabolischen Syndrom befasst.

Da im CACT-Gen nur sehr wenige Polymorphismen bekannt sind, soll dieses Gen zunächst sequenziert werden, um mögliche noch unbekannte Polymorphismen zu identifizieren. Diese sollen dann auf ihren Zusammenhang zu Parametern des Metabolischen Syndroms untersucht werden. Zusätzlich soll eine Assoziation zwischen bekannten Polymorphismen von CPT 1 und CPT 2 und dem Fettstoffwechsel sowie dem Metabolischen Syndrom untersucht werden. Zur Sequenzierung des CACT-Gens wird eine randomisierte Auswahl von 47 Probanden aus einer Population von 755 kaukasischen Probanden gewählt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Methoden**

#### **2.1.1 Probandenrekrutierung und Beschreibung der Kohorte**

Zur Sequenzierung des CACT-Gens wurden randomisiert 47 Probanden aus der Metabolic Intervention Cohort Kiel (MICK) ausgewählt. Diese Kohorte umfasst 755 Männer zwischen 45 und 65 Jahren aus dem Kieler Raum. Die geringe Altersspanne wurde gewählt um den Einfluß der altersbedingten Änderung der Blutfettwerte auf die Prävalenz des Metabolischen Syndroms weitestgehend zu vermeiden. Die Studienteilnehmer wurden vor Teilnahme schriftlich über die Untersuchung aufgeklärt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Kiel auf ethische Unbedenklichkeit geprüft. Im Zuge der Studie wurden die Teilnehmer angehalten standardisierte Fragen in Bezug auf Ihre persönliche und Ihre familiäre Anamnese zu beantworten. Diese Fragen bezogen sich z.B. auf sportliche Aktivitäten, Konsum von Nikotin und Alkohol, Essverhalten und sozialen Stand. Es wurden Größe, Gewicht (ohne Schuhe und Jacke), Taillenumfang, Hüftumfang, Puls und Blutdruck erfasst. Zusätzlich wurden Stoffwechselfparameter (Cholinesterase, GGT, GOT, GPT, HDL, LDL, Gesamtcholesterin, CRP, Hämatokrit, Hämoglobin, Erythrozytenzahl, MCV, MCH, MCHC, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und Kreatinin), sowie nüchtern Insulin-, Triglyzerid- und Glucosewerte erfasst. Blutproben für die DNA-Extraktion wurden in EDTA-Monovetten bei -20°C gelagert. Die oben genannten Untersuchungen wurden ergänzend zu den beiden, weiter unten beschriebenen, postprandialen Tests bei 755 beteiligten Teilnehmern durchgeführt.

##### **2.1.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien für die Studie**

Einschlusskriterium für die Studie waren männliches Geschlecht und ein Alter zwischen 45 und 65 Jahren. Die Probanden wurden über das Melderegister der Stadt Kiel kontaktiert und in einer Informationsveranstaltung über das Projekt informiert. Zu einem Ausschluss von der Studie führten eine unbehandelte Hypo- oder Hyperthyreose, höhergradige Niereninsuffizienz, Cholestase, eine vorliegende Hepatitis oder andere chronische Lebererkrankungen. Weiterhin zum Ausschluss führte ein bekannter Diabetes mellitus Typ 1

oder 2 und das Vorliegen einer Erkrankung, die Nährstoffresorption, Verdauungsfunktion, Verstoffwechselung oder Ausscheidung beeinflusst.

Eine Operation des Intestinaltraktes oder eine Kortikosteroidbehandlung, welche weniger als 3 Monate zurücklagen führten ebenso zu einem Ausschluß wie die Einnahme von Medikamenten, die den Lipidstoffwechsel beeinflussen, eine bestehende Alkoholabhängigkeit oder exzessiver chronischer Alkoholkonsum, eine Anämie mit einer Hämoglobinkonzentration von weniger als 12 g/dl oder ein Krebsleiden.

### **2.1.1.2 oGTT**

Die Probanden wurden im Zuge der Studie zunächst einem oralen Glucose-Toleranz-Test (oGTT) unterzogen, dieser ermöglicht sowohl die Messung der Insulinsensitivität nach HOMA, als auch die Diagnose eines Diabetes mellitus und einer gestörten Glucosetoleranz.

Hierzu wurde dem Probanden 75 g Glucose, die in 250 ml Wasser aufgelöst war, innerhalb von 5 Minuten verabreicht. Nach ½, 1, 2, 3 und 4 Stunden wurde die Insulin- und Glucosekonzentration nach Blutentnahme im Plasma bestimmt.

### **2.1.1.3 oMTT**

Dieser standardisierte orale metabolische Toleranztest (oMTT) dient der Erstellung eines Profils für den Verlauf der Blutkonzentration von Triglyzeriden, Glucose und Insulin nach Verzehr einer Testmahlzeit. Die Testmahlzeit besteht aus einer standardisierten, gemischten Flüssignahrung, die Makronährstoffe entsprechend einer „western diet“ enthält (Fett 51,6 kcal% [vorwiegend gesättigt], Kohlenhydrate 29,6 kcal% und Protein 11,9 kcal%). Blutproben wurden nach ½, 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden zur Bestimmung von Insulin, Glucose und TG entnommen. Zur Bestimmung der Triglyzeridwerte wurden Blutproben stündlich bis zur 9. Stunde entnommen.

### **2.1.1.4 Auswahl der CPT SNP**

Die Auswahl der zu untersuchenden single nucleotide polymorphism (SNP) von CPT erfolgte auf Basis entsprechender Literatur und den Einträgen in der dbSNP Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>). Für die Untersuchung wurden alle kodierenden in der dbSNP Datenbank katalogisierten SNP im CPT 1- und CPT 2-Gen

ausgewählt. Schließlich wurden vier SNP genotypisiert. Die Lokalisation und Allelfrequenz der SNP sind in Tabelle 2 ersichtlich. Von diesen vier SNP hatte ein SNP rs2269383 (CPT1b, 320 G/D) eine sehr niedrige Allelfrequenz von 0,009 (Tabelle 2), aufgrund der geringen statistischen Aussagekraft wurde dieser SNP nicht untersucht. Die in die statistische Analyse eingehenden SNP waren rs470117 (CPT1b, 531 E/K), rs3213445 (CPT1b, 66 I/V) und rs1799821 (CPT2, 368 V/I).

## 2.1.2 Laborarbeiten

### 2.1.2.1 DNA-Gewinnung

Die für die Sequenzierungen benötigte genomische DNA wurde aus 10ml EDTA-Vollblut extrahiert.

Die Gewinnung der DNA wurde in sechs Schritten durchgeführt.

1. **Lyse der Blutproben:** Als erstes wurde eine 10 ml Blutprobe und 500 µl proteinaseK in ein 50 ml Röhrchen pipetiert. Es wurden dann 10 ml des Puffers BQ 1 hinzugefügt und für 10 sec gevortext. Nach Mischung wurde die Probe bei 56°C für 15 min inkubiert.
2. **Einstellung der DNA-Bindung:** Nach Inkubation wurde 10 ml Ethanol (96-100 %) hinzugefügt und erneut für 10 sec gevortext. Dabei wurde das Lysat auf Zimmertemperatur abgekühlt.
3. **Bindung der DNA:** Für jede Aufbereitung wurde eine NucleoSpin® Blood XL Säule in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Hinzu kamen 15 ml des Lysates. Anschließend wurde für 3 min bei 4000 g zentrifugiert. Der Vorgang wurde mit den restlichen 15 ml des Lysates wiederholt.
4. **Waschen der Silica Membran:** Das Waschen der Membran wurde in 2 Schritten durchgeführt. Es wurden 7,5 ml des Puffers BQ 2 der NucleoSpin® BloodXL Säule hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde für 2 min bei 4000 g zentrifugiert. Beim zweiten Waschgang wurden erneut 7,5 ml des BQ 2 Puffers hinzugefügt und für 10 min bei 4000 g erneut zentrifugiert.
5. **Trocknung der Silica Membran:** Die Trocknung der NucleoSpin® Blood XL Säule wurde durch die Zentrifugation des zweiten Waschvorgangs durchgeführt.
6. **Herauslösung der hochreinen DNA:** Zur Lösung der DNA wurde die Säule in ein neues 50 ml Sammelröhrchen gegeben und 1000 µl vorgewärmter Lösungspuffer BE

(70°C) direkt auf die Mitte der Silica Membran gegeben. Der Ansatz wurde 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach für 2 min bei 4000 g zentrifugiert.

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Integrität wurde mittels Gel-Elektrophorese überprüft.

Die benötigte DNA für die Genotypisierung der Polymorphismen wurde aus 100 µl sedimentiertem Blut gewonnen.

### **2.1.2.2 Amplifikation des CACT-Gens**

Aus der genomischen DNA wurden mit Hilfe der entwickelten Primer durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) die einzelnen Exone in Form von DNA-Fragmenten amplifiziert. Die zugehörigen Primerpaare, wurden teilweise aus der Literatur [Iacobazzi 1998] übernommen oder auf Grundlage der vorliegenden Referenz-DNA modifiziert.

Die entsprechenden Primersequenzen, Schmelztemperaturen und die zu synthetisierenden Fragmentlängen sind Tabelle 1 zu entnehmen. Für die zur Amplifizierung notwendigen PCR wurde das Taq DNA Polymerase-Kit (recombinant) der Firma Invitrogen verwendet. In einem Kit enthalten ist die Taq-Polymerase, 10x Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4) mit 500 mM KCl) und 50 mM MgCl<sub>2</sub>. Ein Reaktionsansatz mit dem Volumen von 25 µl enthielt unter Standardbedingungen:

1. 1 µl DNA
2. 0,5 µl von jedem Primer in einer Konzentration von 100 pmol/µl
3. 0,5 µl dNTP in einer Konzentration von 10 mM
4. 0,75 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM
5. 2,5 µl 10 fach Puffer
6. 0,2 µl Taq-Polymerase
7. 19,05 µl sterilisiertes H<sub>2</sub>O reinst.

Bei einem Ansatz mit 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> wurde 1,25 µl einer 50 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung zugesetzt ebenso wurde das Volumen dNTP's auf 0,85 µl erhöht. Um das Reaktionsvolumen von 25 µl pro Ansatz beizubehalten wurde das Volumen an sterilisiertem H<sub>2</sub>O reinst. entsprechend reduziert. Im Thermocycler wurden nach 10 min initialer Denaturierung bei 94°C folgende Programmzyklen durchlaufen:

10

1. 40 sec bei 94°C
  2. 40 sec bei Annealing Temperatur + 2°C
  3. 1 min bei 72°C
- } 5x

1. 40 sec bei 94°C
  2. 40 sec bei Annealing Temperatur
  3. 1 min bei 72°C
- } 5x

1. 40 sec bei 94°C
  2. 40 sec bei Annealing Temperatur - 2°C
  3. 1 min bei 72°C
- } 40x

Anschließend wurde die Temperatur für 10 min bei 72°C gehalten. Die Reaktionsansätze wurden dann auf 4°C abgekühlt und bis zur Entnahme der Proben bei dieser Temperatur gehalten.

Die Annealing Temperatur ist die Temperatur, bei der sich die entsprechenden Primer an den vorliegenden DNA-Strang anlagern. Die höhere Temperatur von 72°C ist eine für die hier verwendete Taq-Polymerase spezifische Temperatur, die für die Kettenverlängerung notwendig ist. 94°C sind zur Denaturierung der DNA erforderlich.

### 2.1.2.3 Primerdesign für das CACT-Gen

Zur Amplifikation des Gens wurden zunächst Primer entwickelt, die den folgenden Regeln entsprachen:

- die Länge der Primer für Vorwärtsstrang und Rückwärtsstrang sollte möglichst gleich sein
- die Schmelztemperatur sollte zwischen 58°C und 62°C liegen, wobei die Differenz der Schmelztemperatur der Primer nicht größer als 2°C sein sollte
- der GC-Gehalt sollte zwischen 40% und 60% liegen, bei einem Idealgehalt von 45% bis 55%
- möglichst keine Basenwiederholungen
- keine komplementären Basen am 3'- und 5'-Terminus
- die Paarung der Primer untereinander sollte nicht möglich sein

- kein Adenin oder Thymin am 3'-Terminus
- nicht mehr als 2 Guanin- und/oder Cytosinbasen in den letzten Nukleotiden am 3'-Terminus

Da die entwickelten Primer nicht zum gewünschten Ergebnis führten, wurden bereits publizierte Primer [Iacobazzi 1998], wie später beschrieben, modifiziert und verwendet (Tabelle 1).

#### **2.1.2.4 Sequenzierung der DNA-Fragmente**

Die Sequenzdaten wurden der Genbank National Center of Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) entnommen. Für die Sequenzierung wurde die DNA von 47 Probanden aus der „Metabolic Intervention Cohort Kiel“ (MICK) isoliert. Die extrahierten DNA-Fragmente beinhalteten 8 der 9 Exone des CACT-Gens. Die einzelnen DNA-Fragmente waren unterschiedlich lang (Tabelle 1). Die Fragmente wurden mit Hilfe einer Terminator Cycle Sequenzierung der Firma BigDye sequenziert. Die Sequenzdaten wurden mit der Software SeqMan<sup>TM</sup>II ausgewertet.

#### **2.1.2.5 Genotypisierung des CACT-Gens**

Nach Sequenzierung der DNA-Fragmente wurde deren Sequenz mit der Sequenz von CACT aus der Datenbank (National Center of Biotechnology Information) verglichen. In der Datenbank sind 85 bekannte SNP verzeichnet. Von diesen 85 SNP liegen 82 in Introns, also nicht kodierenden Bereichen des Genes. Ein SNP liegt im Startcodon von Exon 1, ein weiterer liegt im Exon 8, und der dritte ist in Exon 9 zu finden, zusätzlich ist in Exon 7 ein SNP beschrieben, seine funktionelle Bedeutung ist gut untersucht, jedoch ist er nicht in der dbSNP Datenbank aufgeführt

Der Vergleich der Basensequenzen erfolgte jeweils für den Vorwärtsstrang und für den Rückwärtsstrang getrennt. Bei Unregelmäßigkeiten in den Basensequenzen wurde die entsprechende Stelle im komplementären Strang die Basensequenz überprüft. Bei dem Primerdesign mußte darauf geachtet werden, daß die Sequenz des Exon vollständig im amplifizierten DNA-Fragment lag.



### **2.1.2.6 Genotypisierung der CPT-Gene und Beschreibung der TaqMan-Methode**

Die Genotypisierung folgender bekannter Polymorphismen CPT1b I66V (rs3213445), CPT1b E531K (rs470117) und CPT2 V368I (rs1799821) wurde mit dem TaqMan System (ABI, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die Fluoreszenzmessungen der Sequenzen wurden mit dem ABI Prism 7900 HT durchgeführt. Die Genotypisierung war bei 716 von 755 Teilnehmern erfolgreich.

Die TaqMan SNP Genotypisierung ist eine PCR-basierte Methode zur Alleldiskriminierung von Single Nucleotide Polymorphisms (SNP). Zur Genotypisierung wurde aus den eingefrorenen Blutproben (10ml EDTA-Vollblut) mittels NucleoSpin® Blood XL-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG D-52355 Düren) die DNA nach Herstellerangaben extrahiert. Prinzipiell funktioniert die Genotypisierung mit der TaqMan-Methode im Sinne einer Real-Time-PCR. Dabei wird der Teil in dem der SNP liegt, bzw. vermutet wird, mit Hilfe eines Primerpaares amplifiziert. Zusätzlich werden zwei Oligonukleotidsonden eingesetzt, die spezifisch an der Stelle des Polymorphismus ansetzen, jeweils spezifisch für die unterschiedlichen Allele. An den 5'-Enden der Sonden sitzen fluoreszierende Reporterfarbstoffe (6-FAM und VIC), zusätzlich sind die beiden Sonden an Ihrem 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Der Quencher unterdrückt den angeregten Reporterfarbstoff.

Während der Amplifikation der DNA Fragmente hybridisiert die TaqMan-Sonde vollständig an den DNA-Strang. Ist die Sonde vollständig an den DNA-Strang hybridisiert wird diese durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut, wodurch der Quencher vom Reporterfarbstoff entfernt und die Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt wird. Hybridisiert die Sonde nicht vollständig an den DNA-Strang, so wird die Sonde durch die Taq-Polymerase nur verdrängt, ohne daß eine Fluoreszenz entsteht. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wird die vorhandene Fluoreszenz mit Hilfe eines Detektors gemessen.

### **2.1.2.7 Statistische Analyse der genotypisierten Sequenzen**

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistics Package for the Social Sciences 11.5 berechnet. Die Allel- und Genotypfrequenzen wurden durch Genzählung ermittelt. Die Studienpopulation wurde auf die Verteilung von Genotypen in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht  $\chi^2$  getestet. Um das Risiko von Polymorphismen der CPT1b- und CPT2-Gene auf gestörte Glucosetoleranz, metabolisches Syndrom, Hypertonie und

Hypertriglyzeridämie als Ordinalparameter abzuschätzen, wurde die Odds Ratio (OR) und das 95% Konfidenzintervall (CI) berechnet (Tabelle 4). Der Zusammenhang zwischen den SNP und Nominalparametern wie Insulin-, Glucose- und Triglyzeridkonzentrationen wurde bei normalverteilten Parametern mit dem Students t-Test berechnet, nicht normalverteilte Parameter wurden vor der Berechnung logarithmiert um eine Normalverteilung zu erreichen. Die Verteilung der stetigen Variablen wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ausgedrückt. Die Variablen, die nicht in einer Normalverteilung vorlagen, wurden vor der Analyse logarithmisch transformiert, die entsprechenden Ergebnisse werden als geometrischer Mittelwert mit Standardfehlerintervall dargestellt. Ein nomineller p-Wert von  $<0.05$  wurde als statistisch signifikant angenommen.

Das Homeostasis Model Assessment (HOMA) ist ein Maß für die Insulinresistenz. Es wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Nüchterninsulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Nüchternglucose } (\text{mg/dl}) / 405$$

Die „Area under the curve“ (AUC) ist ein Parameter zur Beurteilung von Reihenmessungen, deren Verlauf als Summe der Einzelbruttoflächen zusammengefasst wird.

Die AUC wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{AUC} = [x_i + x_{i+1}] / 2 \times [t_{i+1} - t_i]$$

AUC = Bruttofläche des untersuchten Parameters jedes Probanden

$x_i$  = Einzelwert

$x_{i+1}$  = auf  $x_i$  folgender Einzelwert

$t_i$  = Entnahmezeitpunkt

$t_{i+1}$  = auf  $t_i$  folgender Entnahmezeitpunkt

## 2.2 Material

### 2.2.1 Verbrauchsmaterial

- Sarstedt-Monovette® 9ml Kalium-EDTA Art.: 02.1066.001 (04.1901) (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)

- Sarstedt-Monovette<sup>®</sup> 2,6ml Fluorid-EDTA Art.: 04.1903 (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- Sarstedt-Monovette<sup>®</sup> 4,7ml Z-Gel Art.: 03.1524 (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- Vasofix<sup>®</sup> Braunüle 178G/1¾“ Art.: 4268130B (Braun Melsungen AG, Deutschland)
- NucleoSpin<sup>®</sup> Blood XL-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)
- E.Z.N.A.<sup>®</sup> Blood DNA MiniKits (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland)
- Taq DNA Polymerase-Kit (recombinant) (Invitrogen Carlsbad, CA, USA)
- Molecular Biology Grade Agarose der Packungsgröße 500g Ref.#: EP-0010-05 (Eurogentec, Serating, Belgien)

### 2.2.2 Geräte

- Zentrifuge: Megafuge 1.OR Bj. 1991 Fabrik-No.: 176125 (Heraeus Sepatech, Deutschland)
- Kolbenhubpipetten 200-1000µl (Eppendorf, Gilson)
- Thermocycler Typ T1 Thermoblock für die DNA-Amplifizierung (Whatman Biometra GmbH i. L., Göttingen, Deutschland)
- ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- ABI 3700 capillary DNA Sequenzierer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- SeqMan<sup>™</sup>II-Software (DNASTAR, Inc., Regent St. Madison, WI, USA)
- Statistics Package for the Social Sciences 11.5 (Chicago, IL, USA)

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Ergebnisse für CACT**

Die Untersuchung der Gensequenz des Pseudogens ergab keine Übereinstimmung zwischen der Sequenz des Genes und den verwendeten Primerpaaren, daher beeinflusste das Vorhandensein dieses Gens unsere Untersuchung nicht.

Die die Primer betreffenden Daten wie Annealing-Temperaturen, DNA-Fragmentlänge und Basensequenzen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

#### **3.1.1 Ergebnis Exon 1**

Im Vorfeld wurden Versuche durchgeführt, um die optimalen Bedingungen zur Amplifizierung der DNA-Fragmente zu finden. Eine Amplifizierung des ersten Exons war trotz mehrmaliger Versuche nicht möglich.

#### **3.1.2 Ergebnis Exon 2**

Es wurden parallel zum Vorgehen bei Exon 1 auf Grundlage der in der Literatur gefundenen Primerpaarungen [Iacobazzi 1998] zur DNA-Sequenz passende Primer modifiziert.

Bei der ersten PCR mit Probanden-DNA kam es zu Ausfällen in der Reaktion, es wurden bei diversen Proben keine Produkte synthetisiert. Die entsprechenden Ausfälle wurden nachfolgend per PCR in 4 kleineren Ansätzen nachsynthetisiert und deren DNA-Fragmente auf einem 2% Agarosegel verifiziert.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden im Folgenden sequenziert. Nach Sequenzierung wurden die Daten mit der Referenz-DNA verglichen. Da die Sequenzen jeweils aus einem Vorwärts- und einem Rückwärtsstrang bestanden, wurden sie getrennt von einander begutachtet. Bei Unregelmäßigkeiten in einem DNA-Strang wurden diese im komplementären DNA-Strang an der entsprechenden Stelle kontrolliert. Es konnten keine Mutationen festgestellt werden.

### 3.1.3 Ergebnis Exon 3

Nach den anfänglichen Schwierigkeiten mit den vorangegangenen Exonen wurde hier das benötigte Primerpaar der Literatur entnommen [Iacobazzi 1998].

Bei den ersten Reaktionsansätzen gab es starke Produktausfälle. Die entsprechenden fehlenden Produkte wurden in kleineren Ansätzen zu jeweils 8 bis 10 Wells nachsynthetisiert und durch Elektrophorese bei 80 [V] auf einem 2%igen Agarosegel verifiziert.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden im Folgenden sequenziert. Ebenfalls nach Sequenzierung wurden auch bei diesem Exon die sich ergebenden DNA-Sequenzen mit der vorliegenden Referenz-DNA verglichen. Die Auswertung ergab keine Mutationen.

### 3.1.4 Ergebnis Exon 4

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Exonen, war eine Optimierung des Primerpaars für dieses Exon nicht möglich. Daher wurden die Primer erneut aus der Literatur [Iacobazzi 1998] als Grundlage zur Modifikation entnommen.

Nach durchgeführter PCR und anschließender Elektrophorese wurden die Produktbanden unter UV-Licht kontrolliert. 9 Proben enthielten keine Produkte. Die fehlenden Produkte wurden in einem weiteren Ansatz nachsynthetisiert

Die synthetisierten DNA-Fragmente wurden im Folgenden sequenziert. Die entsprechenden Daten wurden wiederum auf Veränderungen hinsichtlich der Referenz-DNA untersucht. Auch hier gab es am Anfang der DNA-Stränge leichte Unregelmäßigkeiten, die jedoch im komplementären DNA-Strang nicht bestätigt werden konnten. Es konnten keine Mutationen festgestellt werden.

### 3.1.5 Ergebnis Exon 5

Bei der Primerauswahl für dieses Exon wurde die Grundlage für das Primerpaar aus der Literatur [Iacobazzi 1998] übernommen.

Die synthetisierten DNA-Fragmente wurden im Folgenden sequenziert.

Obwohl die Bandenmuster keinen Hinweis auf Polymorphismen ergaben, wurde die Sequenz der DNA-Fragmente mit der Referenz-DNA verglichen. Ebenso wie bei den vorhergehenden Analysen, gab es wenige Unregelmäßigkeiten am Kettenanfang, jedoch konnten diese im Komplementärstrang nicht verifiziert werden. Aufgrund des Ergebnisses des DNA-

Vergleichs, kann man sagen, daß in der untersuchten DNA keine Mutationen im Exon 5 vorliegen.

### **3.1.6 Ergebnis Exon 6**

Zur Primerwahl bei diesem Exon konnte der Primer, der für den Vorwärtsstrang notwendig ist aus der Literatur [Iacobazzi 1998] übernommen werden. Für den Primer des Rückwärtsstranges war es jedoch wiederum notwendig Modifikationen der Primersequenz vorzunehmen.

Nach Amplifizierung der DNA-Fragmente wurden diese im Folgenden sequenziert. Nach Sequenzierung wurden wiederum die Daten mit der Referenz-DNA verglichen und keine Mutationen festgestellt.

### **3.1.7 Ergebnis Exon 7**

Die Primer für dieses Exon wurden ohne Modifikation aus der Literatur [Iacobazzi 1998] übernommen.

Nach Amplifizierung der DNA-Fragmente wurde das Amplifikationsergebnis ebenfalls auf einem 2% Agarosegel verifiziert.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden im Folgenden sequenziert und enthielten keine Mutationen

### **3.1.8 Ergebnis Exon 8**

Bei der Primerpaarung für Exon 8 wurde der Primer für den Vorwärtsstrang auf Grundlage der Literatur [Iacobazzi 1998] modifiziert und der Primer für den Rückwärtsstrang übernommen.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden im Folgenden sequenziert und die Daten mit der Referenz-DNA verglichen. Es wurden auch hier keine Mutationen gefunden.

### **3.1.9 Ergebnis Exon 9**

Das letzte Exon des untersuchten Gens wurde ebenfalls unter zu Hilfenahme eines Primerpaares untersucht. Die beiden Primer wurden bis auf eine kleine Modifikation des Rückwärtsprimers (ohne Thymin am Ende) vollständig übernommen [Iacobazzi 1998].

Im Zuge der Optimierung wurde eine  $\text{MgCl}_2$  Konzentration von 2,5 mM gewählt, wobei sich eine Annealing Temperatur von 58°C als optimal zeigte. Nachdem unter diesen Bedingungen eine PCR mit Probanden-DNA durchgeführt, stellten wir einen Ausfall diverser Produkte fest. Fehlende Produkte wurden mit Hilfe von 3 kleineren Ansätzen ersetzt.

Die amplifizierte DNA-Fragmente wurden im Folgenden sequenziert und die Daten mit der Referenz-DNA verglichen. Es waren keine Mutationen feststellbar.

### 3.2 Ergebnisse für die CPT 1b SNP

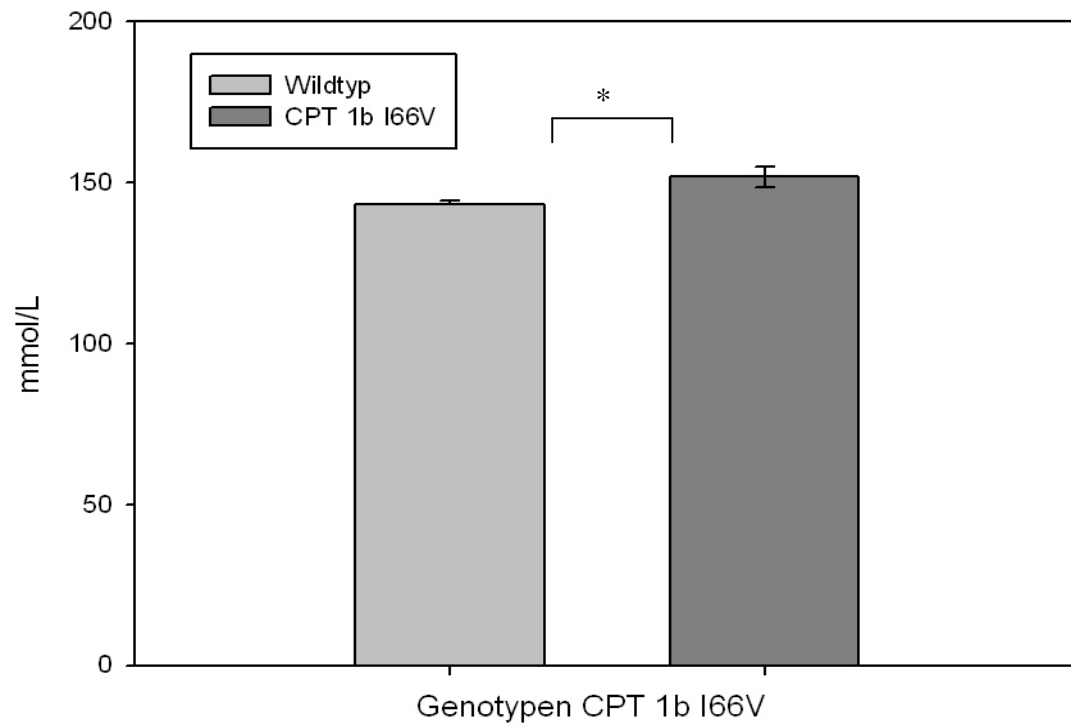
In der MICK (Metabolic Intervention Cohort Kiel), konnte bei 716 der 755 kaukasischen Männern die Genotypisierung für die CPT 1b SNP erfolgreich durchgeführt werden. Es wurden folgende Allelfrequenzen für die Polymorphismen festgestellt: rs470117: 0,27 und rs3213445: 0,10 (Tabelle 2). Die Allelfrequenzen entsprachen in etwa denen, die in einer französisch-kanadischen Studie [Robitaille 2007] festgestellt werden konnten und zusätzlich in der dbSNP Datenbank publiziert waren. Der vierte von uns untersuchte SNP, welcher innerhalb des CPT 1b-Gens lag, wurde bisher nicht in der Literatur oder Datenbank beschrieben und weist eine sehr geringe Allelfrequenz (0,009) auf. Für die nachfolgende Genanalyse wählten wir auf Basis ihrer kleinsten Allelfrequenz (über 10%) die beiden vorgenannten SNP in den codierenden Sequenzen des CPT 1b-Gens aus.

Aufgrund der relativ geringen Allelfrequenz des CPT1b-SNP I66V wurden für die weitere Analyse dieses SNP die homozygoten Träger (II) mit den heterozygoten Trägern (IV) zusammengefasst. Für den SNP CPT1b E531K wurden die homozygoten Träger des seltenen Allels (KK) gegen die Heterozygoten (EK) und Homozygoten (EE) des häufigen Allels getestet.

Tabelle 3 zeigt die Auswertung des statistischen Zusammenhanges der untersuchten SNP mit den Parametern des metabolischen Syndroms. Die Genotypgruppen der untersuchten SNP unterscheiden sich nicht in den potentiellen Confoundern Alter, BMI und Taillenumfang, von daher mussten die nachfolgenden Ergebnisse nicht um diese Parameter statistisch korrigiert werden.

Bei den homo- und heterozygoten Trägern des Polymorphismus CPT1b I66V konnten wir eine signifikante Erhöhung der Nüchterntriglyzeride, der LDL-Konzentration und der postprandialen Triglyzeride (AUC) gegenüber dem Wildtyp feststellen (Tabelle 3). Die LDL-

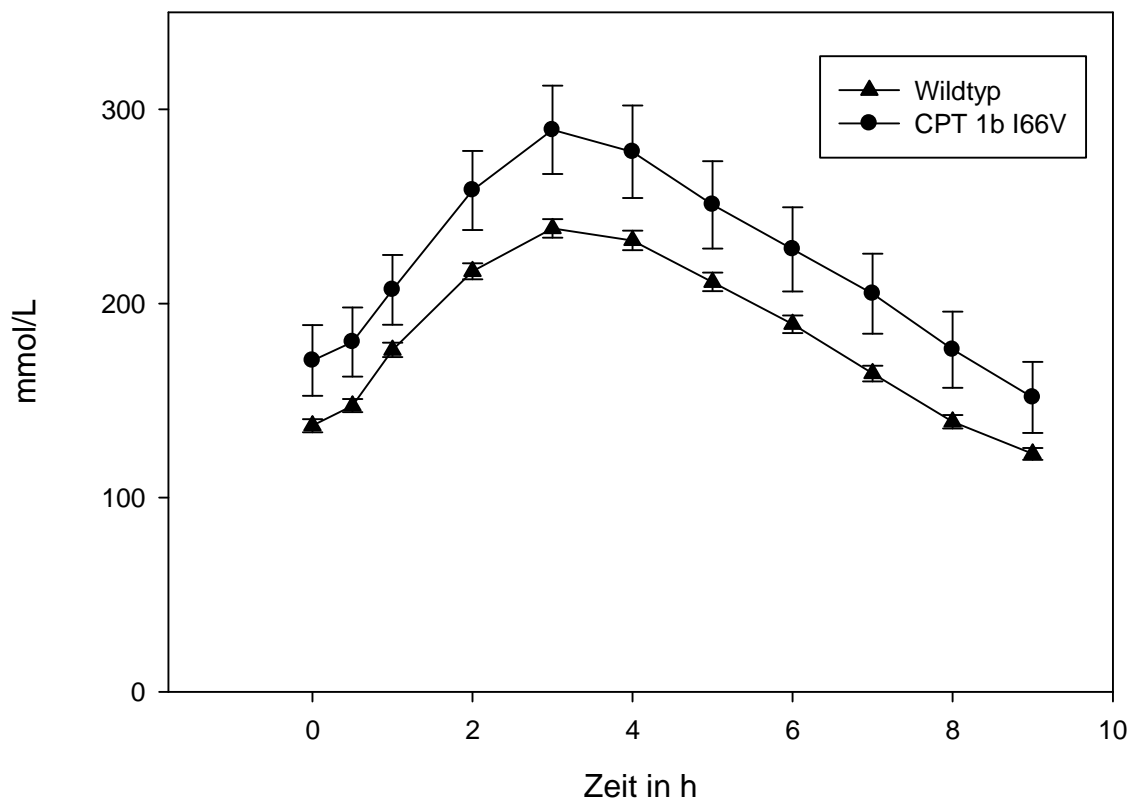
Konzentration betrug bei den Trägern der Mutation 151,74 mmol/l vs. 142,99 mmol/l bei den Homozygoten des Wildtyps ( $p=0,02$ ) (Diagramm 1).



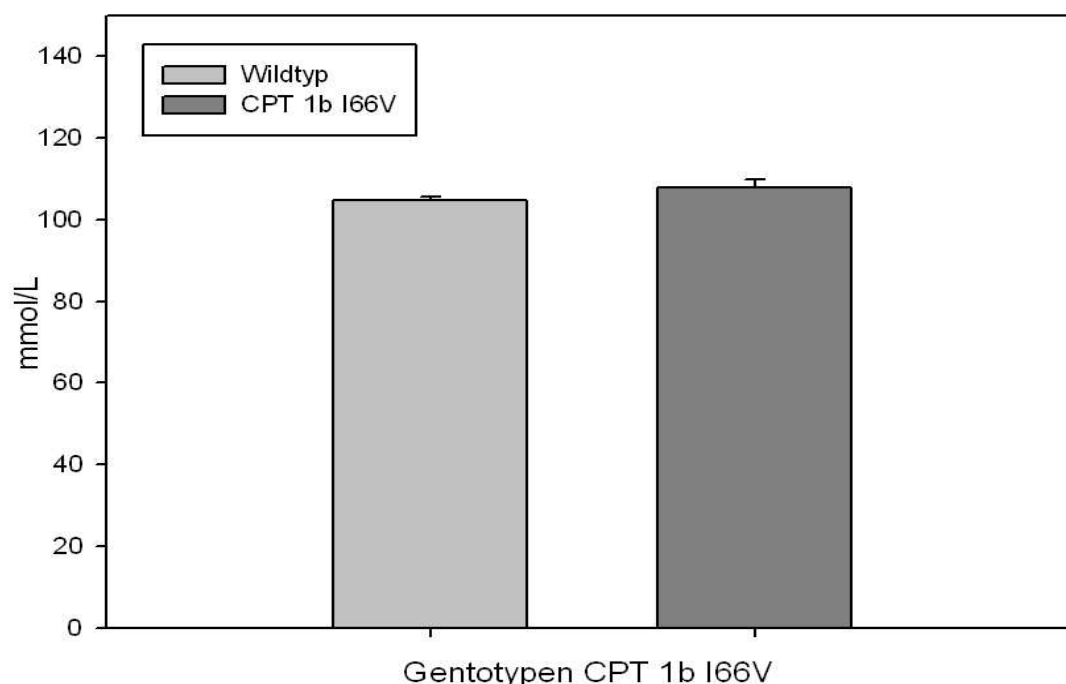
**Diagramm 1 LDL-Konzentration, Vergleich der Träger von CPT 1b I66V zum Wildtyp**



Die Nüchtertriglyzeride bei den Trägern des SNP im Vergleich zum Wildtyp betrugen 170,56 mg/dl vs. 137,02 mg/dl,  $p=0,02$ . Mit noch höherer Signifikanz waren die postprandialen Triglyzeride unterschiedlich (2037,42 vs. 1688,44,  $p=0,008$ ) (Tabelle 3) (Verlauf über 9h siehe Diagramm 2). Eine Auswertung mittels Chi-Quadrat-Test ergab in unserer Kohorte bei dem CPT1b I66V SNP ein signifikant höheres Risiko für eine Hypertriglyzeridämie ( $OR=2,21$ ,  $p=0,002$ ). (Tabelle 4). Jedoch besteht kein erhöhtes Risiko für eine gestörte Glucosetoleranz, das metabolische Syndrom oder eine Hypertonie (Tabelle 4).



**Diagramm 2 Verlauf der Triglyzeridwerte während des oMTT, Vergleich der Träger von CPT 1b I66V zum Wildtyp**



**Diagramm 3 Nüchtern glucose, Vergleich der Träger von CPT 1b I66V zum Wildtyp**

Bei den homozygoten Trägern des CPT1b E531K Polymorphismus war ebenfalls eine signifikante Erhöhung der LDL-Konzentration gegenüber dem Wildtyp zu verzeichnen (148,78 mg/dl vs. 142,10 mg/dl,  $p=0,02$ ) (Tabelle 3). Eine statistische Auswertung mittels Chi-Quadrat-Test ergab in unserer Kohorte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem untersuchten CPT1b E531K SNP und gestörter Glucosetoleranz, metabolischem Syndrom, Hypertonie oder Hypertriglyzeridämie (Tabelle 4). Ein statistischer Zusammenhang zwischen diesem SNP und einer erhöhten Nüchterntriglyzeridkonzentration oder erhöhten postprandialen Triglyzeriden konnte im Gegensatz zum CPT 1b I66V SNP nicht festgestellt werden.

Für beide SNP konnte kein statistischer Zusammenhang zum Glucose- und Insulinstoffwechsel (Tabelle 3) hergestellt werden. Ebenfalls ergab sich keine Korrelation zwischen den beiden untersuchten CPT 1b SNP und Alter, BMI, WHR, Taillenumfang, Blutdruck und HDL-Konzentration.

### 3.3 Ergebnisse für den CPT 2 SNP

In der MICK (Metabolic Intervention Cohort Kiel), konnte bei 716 kaukasischen Männern die Genotypisierung für den CPT 2 SNP erfolgreich durchgeführt werden. Folgende

Allelfrequenz ergab sich für den Polymorphismus rs1799821: 0,66 (Tabelle 2). Die Allelfrequenz entspricht in etwa der in der dbSNP Datenbank publizierten.

Der untersuchte Polymorphismus innerhalb des CPT 2-Gens wurde bisher in keiner Assoziationsstudie untersucht, jedoch war er in der von uns verwendeten dbSNP Datenbank auffindbar. Für die nachfolgende Genanalyse wählten wir zusätzlich zu den beiden CPT 1b SNP den oben genannten SNP in der codierenden Sequenz des CPT 2-Gens aus.

Für den SNP CPT2 V368I wurden die homozygoten Träger des seltenen Allels (II) gegen die heterozygoten (VI) und homozygoten (VV) des häufigen Allels getestet.

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der statistischen Analyse der untersuchten SNP mit den Parametern des metabolischen Syndroms. Die Genotypgruppen der untersuchten SNP unterscheiden sich nicht in den potentiellen Confoundern Alter, BMI und Taillenumfang, von daher mussten die nachfolgenden Ergebnisse nicht um diese Parameter statistisch korrigiert werden.

Bei den homozygoten Trägern des CPT2 V368I Polymorphismus waren die Nüchterntriglyzeride in der Gruppe der homozygoten Träger des Polymorphismus gegenüber der Gruppe mit Wildtyp und heterozygoten Trägern signifikant erniedrigt (124,38 mg/dl vs. 143,21 mg/dl,  $p=0,03$ ) (Tabelle 3).

Die weitere statistische Auswertung ergab keine Korrelation zwischen dem untersuchten CPT 2 SNP und Alter, BMI, WHR, Taillenumfang, Blutdruck, HDL-Konzentration, HOMA, Glucose- und Insulinkonzentrationen. Gleiches gilt für die LDL-Konzentration und postprandiale Triglyzeride. Die Berechnung eines Chi-Quadrat-Test ergab in unserer Kohorte keinen Zusammenhang zwischen dem CPT2 SNP und gestörter Glucosetoleranz, metabolischem Syndrom, Hypertonie oder Hypertriglyzeridämie.

## 4 Diskussion

### 4.1 Folgen einer Unterfunktion von CACT, CPT 1 oder CPT 2

Zurzeit sind 32 Fälle einer CACT Unterfunktion beim Menschen in der Literatur beschrieben. Von diesen Studien befassen sich insgesamt 8 mit dem genetischen Aspekt einer Unterfunktion, diese sind weiter unten erläutert. 15 Artikel stützen Ihre Vermutung einer CACT Unterfunktion im Wesentlichen auf Aktivitätsmessungen von CACT vor allem in Hautfibroblasten, auf einer Ausschlußmethodik, klinischer und/oder Labordiagnostik, in einigen Fällen stützt sich Ihre Vermutung auf die Messung der  $\beta$ -Oxidationsrate in Leukozyten oder Fibroblasten [IJlst 2001, Chalmers et al. 1997, Huizing 1998, Brivet et al. 1999, Pande et al. 1993, Olpin et al. 1997, Nuoffer et al. 2000, Parini et al. 1999, Niezen-Koning et al. 1995, Galron et al. 2004].

Die entsprechenden Symptome, die mit einer Unterfunktion von CACT in Verbindung gebracht werden sind folgende: Hypoketose, Hypoglykämie [Chalmers et al. 1997, Huizing et al. 1998, Huizing et al. 1997, Brivet et al. 1999, Pande et al. 1993, Olpin et al. 1997, Nuoffer et al. 2000, Parini et al. 1999, Niezen-Koning et al. 1995, Ogier de Baulny et al. 1995, Lopriore et al. 2001, Röschinger et al. 2000], Hyperammonämie [Huizing et al. 1998, Rubio-Gozalbo et al. 2003, Pande et al. 1993, Nuoffer et al. 2000, Niezen-Koning et al. 1995, Stanley et al. 1992, Galron et al. 2004, al Aqeel et al 1999, Röschinger et al. 2000], Hypokalziämie [Wasant et al. 2002], Hyperkaliämie [Niezen-Koning et al. 1995, Wasant et al. 2002], unterschiedlich stark ausgeprägte Bikarbonat Azidurie [Huizing et al. 1998, Ogier de Baulny et al. 1995, Lopriore et al. 2001, Yang et al. 2001, Röschinger et al. 2000], Leberverfettung mit abnormaler Leberfunktion [Niezen-Koning et al. 1995], verschiedene kardiale Symptome und Skelettmuskelschwäche [Huizing et al. 1998, Rubio-Gozalbo et al. 2003, Niezen-Koning et al. 1995, Ogier de Baulny et al. 1995, Stanley et al. 1992, al Aqeel. et al. 1999, Choong et al. 2001, Yang et al. 2001, Brivet et al. 1996]. Auch kam es in einigen Fällen zu einer metabolischen Azidose [al Aqeel et al. 1999, Wasant et al. 2002]. Zusätzlich sind Atemnot und Krampfanfälle beschrieben [Stanley et al. 1992].

Die Überlebensrate der betroffenen Kinder ist gering, eine Lebenserwartung von bis zu drei Jahren bei starker Ausprägung wird beschrieben [Lopriore et al. 2001, Röschinger et al. 2000]. Liegt ein milder Phänotyp vor, ist ein Überleben über die Kindheit hinaus möglich [Lopriore et al. 2001, Röschinger et al. 2000]. Mehr als 40 % der Gesamtkalorien menschlicher Milch

werden durch Lipide bereitgestellt. In diesem Zusammenhang wird Carnitin und die damit zusammenhängenden Transportenzyme bei einem Neugeborenen zu wichtigen Faktoren für die Energiegewinnung aus Fettsäuren [Röschinger et al. 2000]. Dieser Umstand begünstigt das Zustandekommen der oben beschriebenen Symptome direkt postpartum, da sich, wie schon erwähnt, die Energiegewinnung der Neugeborenen hauptsächlich auf  $\beta$ -Oxidation stützt [Röschinger et al. 2000].

Die eingeschränkte Lebenserwartung dieser Patienten unterstreicht die Funktion von CACT als essentielles Stoffwechselenzym.

Die Hypoglykämie wird durch den raschen Verbrauch hepatischer Glycogenspeicher und eine gestörte Glukoneogenese hervorgerufen [Röschinger et al. 2000]. Die Hypoketose wird durch einen mangelhaften Fettsäuretransport und der daraus folgenden erniedrigten Bereitstellung von Acetyl-CoA induziert. Die Hyperammonämie resultiert aus der limitierten Verfügbarkeit von N-Acetylglutamat (dieses wird von Acetyl-CoA abgeleitet). Das N-Acetylglutamat ist essentiell für das Enzym Carbamoylphosphat Synthase im Harnstoffzyklus.

Die Fehlfunktion von CACT bewirkt eine unzureichende bzw. fehlende  $\beta$ -Oxidation. Dadurch werden die aus dem Blut aufgenommenen Fettsäuren im Cytosol angereichert und führen zur Bildung von Lipidtropfen, dies schränkt die Funktionsfähigkeit der Zelle ein [Choong et al. 2001].

Es ist daher denkbar, daß eine Funktionseinschränkung von CACT, hervorgerufen durch einen Aminosäuretausch bei einer Punktmutation, eine Steatose von Leber-, Muskel- und anderen Körperzellen hervorruft. Diese intramyozelluläre sowie intrahepatische Verfettung kann zu einer Insulinresistenz führen, da sie mit dem metabolischen Syndroms assoziiert ist [Eckel et al. 2005].

## 4.2 Beschriebene genetische Defekte von CACT in der Literatur

Galron et al. [Galron et al. 2003] bestimmten die  $\beta$ -Oxidationsrate in Lymphozyten, diese war im Vergleich zum Normwert erniedrigt bei gleichzeitiger normaler Aktivität von CPT 1 und 2. Eine genetische Untersuchung ergab eine homozygot rezessive Mutation an Position 793 5 Basenpaare vom Ende des Exon 7 entfernt. Die Mutation ist durch den Austausch von Adenin gegen Guanin gekennzeichnet. Als Folge dieses Austausches wird bei der Synthese des Carriers an dieser Stelle Glutamin durch Arginin ersetzt. Dieser beschriebene SNP ist in der

dbSNP Datenbank aufgrund seiner extremen Seltenheit nicht verzeichnet. Eine Allelfrequenz ist nicht angegeben.

Ogawa et al. [Ogawa et al. 2000] berichten über zwei Mutationen, eine ist eine Deletion an Position 146, hier ist die Base Thymin deletiert, diese Deletion führt zu einer vollständig anderen Aminosäuresequenz des synthetisierten Proteins von Codon 28 bis zum vorzeitigen Stop-Codon 128 (normale Länge des Proteins 301 Aminosäuren). Bei der weiteren Untersuchung konnte eine Punktmutation an Position 261-10 T nach G (10 Basen Strangaufwärts von der der Splicestelle entfernt) festgestellt werden, Ogawa et al. [Ogawa et al. 2000] vermuten, daß diese Punktmutation zu einer Splicing-Mutation führt, diese äußert sich in einem Überspringen des Exon 3 und 4 oder nur des Exon 3. Die Exone sind für Transskription der zweiten, respektive der dritten Transmembrandomäne verantwortlich, ein Wegfall der Exone führt zu einem stark verkürzten Enzym, welches seine Funktion nicht ausführen kann.

Huizing et al. [Huizing et al. 1998] berichten über zwei größere heterozygote Deletionen in der cDNA des CACT Gens. Das genetische Material gewannen sie aus RNA, welche sie aus Hautfibroblasten extrahiert hatten. Eine Deletion war bei Basenpaar 128 des Fragmentes (Basenpaare 261-388) und die andere bei Basenpaar 110 im Fragment (Basenpaare 671-780) zu finden. Die Deletionen führten zu einer drastischen Verkürzung des Produktes von einer Länge von 301 Aminosäuren in der Wildform auf eine Länge von 139 Aminosäuren respektive 211 Aminosäuren. Die Deletionen führten klinisch zu einer für eine CACT-Unterfunktion typischen Symptomatik. Man kann die beobachtete Deletion jedoch nicht direkt auf eine Deletion im Genom zurückführen, es ist durchaus möglich, daß die Deletion durch einen Fehler beim Splicing auftrat.

Huizing et al. [Huizing et al. 1997] berichtet in einer weiteren Publikation über einen Patienten, bei dem in der Region zwischen Basenpaar 955 und 959 eine Base Cytosin inseriert ist, dies führt zu einer Verlängerung der Aminosäurekette um 21 Aminosäuren auf 322 Aminosäuren. Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms, eine hydrophobe Domäne wird hinzugefügt. Huizing et al. vermuteten, daß diese Konformationsänderung zu einem instabilen Protein führt.

Costa et al. [Costa et al. 1999] berichten von einer homozygoten Substitution im CACT Gen, bei der Cytosin gegen Thymin getauscht wurde. Die Substitution bewirkt einen vorzeitigen Kettenabbruch, was zu einem Protein mit einer Länge von nur 166 Aminosäuren führt. Das

genetische Material wurde per reverser Transskription aus RNA gewonnen. Der Kettenabbruch führte zu einer vollständigen Inaktivität des Enzyms.

Ijlst et al. [Ijlst et al. 2001] berichten über zwei Defekte von CACT, der erste Defekt entspricht dem von Huizing et al. [Huizing et al. 1997] der zweite Defekt betrifft eine homozygote Substitution an Position 241 der cDNA. Hierbei ist die Base Guanin durch Adenin getauscht. Dieser Tausch bewirkt einen Wechsel in der Aminosäuresequenz von Glycin an Position 81 zu Arginin. Eine vollständige Inaktivierung von CACT ist die Folge.

Yang et al. [Yang et al. 2001] verwendete zur Gewinnung der cDNA von CACT ebenfalls eine reverse Transskription. Eine Messung der Länge der cDNA ergab eine verkürzte Länge von 832 Basenpaaren und 741 Basenpaaren. Bei dem längeren Fragment fehlt die genetische Information des Exon 3 und bei dem kürzeren Fragment fehlen sowohl die Informationen aus Exon 3 als auch von Exon 4. Die gefundene Mutation ähnelt der von Ogawa et al. [Ogawa et al. 2000] gefundenen. Eine direkte Amplifizierung der Exone 2, 4 und 5 ergab keine Mutation im genetischen Code oder den Splicestellen. Bei der direkten Amplifikation des Exon 3 konnte eine einzelne homozygote Deletion an Position 388 festgestellt werden. Hier fehlt die Base Guanin. Da die Deletion an Position einer Splice Stelle lokalisiert ist, kann sie zu einem abweichenden Spliceergebnis führen. Das Spliceergebnis führt zu einer 13 Bp langen Insertion in der mRNA. Eine abweichende Funktion von CACT ist nicht beschrieben.

Die oben beschriebenen genetischen Defekte zeigen, daß größere Veränderungen des CACT-Gens wie Deletionen, Substitutionen oder Insertionen zu gravierenden Funktionseinschränkungen führen können Diese haben einen letalen Ausgang zur Folge. Die Ergebnisse zeigen ebenfalls, daß das CACT-Gen sehr konservativ vererbt wird. Diese konservative Vererbung begründet die absolute Seltenheit einer genetischen Veränderung bei noch lebenden Patienten und begründen den fehlenden Nachweis in einer größeren Bevölkerungsgruppe, bzw. die Nichteinflußnahme an einer Gesellschaftskrankheit wie dem Metabolischen Syndrom.

### 4.3 Beurteilung der Ergebnisse für CACT

Im Laborversuch verringert Insulin in Anwesenheit von Acetylcarnitin bei Zellen, die mit CACT-Antikörpern behandelt wurden, das Verhältnis von Acyl-Carnitin zu Acyl-CoA. Bei einer Inhibition von CACT würde die Acetyl-CoA Konzentration, die durch mitochondriale Substratoxidation hervorgerufen wird, sinken [Peluso et al. 2005]. Ein Absinken der

cytosolischen Acetyl-CoA Konzentration kann darauf zurückgeführt werden, daß durch den Defekt von CACT kein Acyl-CoA in die Mitochondrien transportiert werden kann, dadurch fehlt es dort zur  $\beta$ -Oxidation und es entsteht kein Acetyl-CoA mehr [Peluso et al. 2005]. Aufgrund der vorgenannten Effekte, die CACT auf die cytosolische Acetyl-CoA Konzentration hat kann man CACT einen regulierenden Effekt auf die Acetyl-CoA Konzentration zuschreiben. Da CACT eine besondere Rolle in der Kontrolle der  $\beta$ -Oxidation hat, wird angenommen, daß eine „down regulation“ von CACT den Lipidstoffwechsel, z.B. einer Skelettmuskelzelle, dahingehend moduliert, daß vermindert Acyl-Carnitin in die Mitochondrien aufgenommen wird [Peluso et al. 2005]. Die Aktivität von CPT 1 und 2 wird jedoch nicht von einer Dysfunktion von CACT beeinflusst [Peluso et al. 2005].

Wir konnten in unserer Untersuchung jedoch keine genetischen Veränderungen feststellen. Dies lässt darauf schließen, daß das CACT-Gen sehr konservativ vererbt wird und es dementsprechend keinen Zusammenhang zum Metabolischen Syndrom gibt. Bei einer Veränderung im CACT-Gen kommt es schon frühzeitig postnatal zur Manifestation der entsprechenden Symptome. Zu den bekannten, seltenen SNP der dbSNP Datenbank des CACT-Gens sind bisher keine Assoziationsstudien veröffentlicht worden. Eine Untersuchung der beschriebenen oder etwaig neuer SNP war in unserer Population nicht möglich, da keine neuen Polymorphismen gefunden wurden und die Allelfrequenz der bekannten SNP zu niedrig ist.

In der von uns untersuchten Population konnte der bekannte SNP in Exon 9 (rs14828) nicht entdeckt werden. In der normalen Wildpopulation kommt an der Position des SNP innerhalb der cDNA die Base Cytosin vor, die Punktmutation liegt vor, wenn in der Sequenz die Base Cytosin durch Thymin ersetzt ist. In der dbSNP Datenbank ist eine Sequenzierung in einer Population von 92 Personen europäischen Ursprungs angegeben, diese hat jedoch ebenfalls keinen SNP Träger ergeben. Von daher ist diese Mutation aufgrund ihrer Seltenheit in unserer Population nicht weiter zu untersuchen.

Der SNP rs35989076 befindet sich in Exon 8. Der Wildtyp weist an Stelle des beschriebenen Defektes Cytosin auf, der SNP ist durch die Base Thymin charakterisiert. Durch die Mutation wird im Protein an Position 258 oder 260 die Aminosäure Arginin (Wildtyp) gegen Glutamin (Mutation) getauscht. Die Mutation weist eine Allelfrequenz von 0,027 in der afro-amerikanischen Bevölkerung auf. Ein Effekt oder weitere Informationen über die Mutation sind in der dbSNP Datenbank nicht beschrieben. Auch dieser SNP konnte in unseren 47 der Sequenzierung zugeführten Probanden nicht nachgewiesen werden.



Die Sequenzierung des CACT-Gens ergab in unserer Untersuchung keine SNP. Daher konnten für dieses Gen keine Assoziationsuntersuchungen zum metabolischen Syndrom durchgeführt werden.

#### **4.4 Beurteilung der Ergebnisse der untersuchten CPT-Polymorphismen**

Für die zwei untersuchten Polymorphismen im CPT1b-Gen und den Polymorphismus im CPT2-Gen haben sich signifikante Assoziationen zu Parametern des metabolischen Syndroms ergeben. Bei allen drei Polymorphismen handelt es sich um Punktmutationen, die zu einem Aminosäuretausch führen. Daher haben diese Polymorphismen eine potentielle funktionelle Relevanz für die Proteinstruktur.

Es sind relevante Ergebnisse beim CPT1b I66V Polymorphismus vorhanden, hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Nüchterntriglyzeride, eine Erhöhung der LDL-Konzentration und eine deutliche Erhöhung der postprandialen Triglyzeride im Vergleich zum Wildtyp. Auch ist die postprandiale Glucose (AUC) nach oMTT tendentiell erhöht. Durch den Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Valin ist es möglich, daß es zu einem „loss of function“ des Enzyms kommt. Dies kann dazu führen, daß es bei Trägern dieses Polymorphismus zu einer Akkumulation von freien Fettsäuren im Serum kommt, diese können dann nicht der  $\beta$ -Oxidation im Mitochondrium zugeführt werden. Die statistische Auswertung zeigt den deutlichen Einfluß, den der CPT1b I66V-Polymorphismus auf den Fettstoffwechsel hat. Der durchgeführte Chi-Quadrat-Test zeigt, daß Träger des CPT1b I66V-Polymorphismus ein mehr als doppelt so hohes Risiko (2,2 fach) (Tabelle 4) haben, eine Hypertriglyzeridämie zu entwickeln. Das Konfidenzintervall reicht hier von einem geringeren Risiko von 1,34 bis zu einem maximalen Risiko von 3,65.

Auf molekularer Ebene ist der SNP durch einen Aminosäuretausch an Position 66 im Protein gekennzeichnet. Bei diesem Austausch ist die Aminosäure Isoleucin beim Wildtyp gegen die Aminosäure Valin bei den SNP-Trägern getauscht. Beide Aminosäuren gehören der Gruppe der hydrophoben und aliphatischen Aminosäuren an. Obwohl beide Aminosäuren derselben Gruppe angehören, unterscheiden sie sich. Im Gegensatz zu Isoleucin, welches gestreckt gebaut ist und dementsprechend ein etwas größeres Volumen einnimmt ist Valin trotz gleich langer Hauptkette ( $c_n=3$ ) eher von kugelförmiger Struktur. Die dreidimensionale Struktur liegt an der Tendenz des Kohlenstoffs seine vier Bindungen bei einer  $sp^3$ -Hybridisierung in einem

Winkel von  $109^\circ$  auszubilden, in etwa einem Tetraeder im Vergleich zum gestreckten Bau des Isoleucins entspricht. Da die genaue Position des aktiven Zentrums von CPT 1b nicht bekannt ist, kann nicht genau bestimmt werden, wo sich Position 66 in der Aminosäuresequenz räumlich befindet. Es ist zu vermuten, daß das anders aufgebaute Molekül des Valin eine Konformationsänderung zumindest des aktiven Zentrums bewirkt. Dieses wäre möglicherweise mit dem etwas kleineren Volumen der Aminosäure erklärbar. Ein kleineres Volumen könnte zur Folge haben, daß zwei hydrophobe Anteile des Proteins dichter zusammenrücken und damit das aktive Zentrum von der räumlichen Ausdehnung her verkleinert wird. Durch eine Verkleinerung des aktiven Zentrums ist es möglich, daß der Metabolit, das Acyl-CoA, nicht mehr vollständig in das aktive Zentrum passt und so eine enzymatische Umsetzung verzögert wird. Auf Ebene des Stoffwechsels kann der SNP durch eine Unterfunktion von CPT 1b dazu führen, daß die Menge an bereitgestellten aktivierten Fettsäuren nicht vollständig zur  $\beta$ -Oxidation verwendet werden kann, dadurch ist eine Akkumulation an Fettsäuren im Cytosol möglich. Die Fettsäuren können unter anderem in die Blutbahn freigesetzt werden und liegen dort in erhöhter Konzentration gebunden an Plasmaalbumin vor. Die erhöhte Konzentration an zirkulierenden freien Fettsäuren im Plasma führt unter anderem zu einer vermehrten Glucosesynthese und einer vermehrten Sekretion von VLDL in der Leber [Eckel et al. 2005]. Ein weiterer Effekt der hohen Konzentration an freien Fettsäuren ist eine Absenkung der Insulinsensitivität im Muskelgewebe durch eine inhibitorische Wirkung auf die insulinvermittelte Glucoseaufnahme in Muskelzellen [Eckel et al. 2005]. Zusätzlich zur Stimulation der Insulinsekretion durch die hohe Glucosekonzentration bewirkt die hohe Fettsäurekonzentration einen additiven Effekt auf die Sekretion von Insulin aus den B-Zellen der Bauchspeicheldrüse [Löffler, Petrides 1998]. Weiterhin verringert die Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma die insulinvermittelte Glucoseaufnahme in die Muskelzellen. Folge dieser verringerten Aufnahme in die Zellen ist ein weiterhin vorhandener hoher Spiegel an Glucose und ebenso ein hoher glucosevermittelte Insulinspiegel. Die Freisetzung von Insulin soll eigentlich zu einem Absinken sowohl der Glucosekonzentration durch Aufnahme in die Zellen als auch der Konzentration an freien Fettsäuren durch die anabole Wirkung des Insulins in Form einer Lipogenese führen. Die durch Insulin ausgelöste Lipogenese in den Leberzellen führt zu einem intrazellulären Anstieg der Triglyzeride, dies kann zu einer vermehrten Ausschüttung von VLDL in Richtung der anderen Körpergewebe als auch zu einer Sekretion von Triglyzeriden direkt ins Blut führen. Trotz Vorhandensein von Insulin kann das Ungleichgewicht im Fett- und

Kohlenhydratstoffwechsel, hervorgerufen durch den SNP, nicht abgebaut werden. Dies führt dann im Folgenden dazu, daß sowohl eine konstant hohe Konzentration an Glucose als auch an freien Fettsäuren im Blut herrscht. Aus dieser Tatsache heraus würde ein hoher Spiegel an Insulin im Blut vorliegen, was über einen längeren Zeitraum hinweg im Sinne einer „down regulation“ zu einer Reduktion der Zahl und Affinität der Insulinrezeptoren führen würde [Boden 1998]. Die Reduktion der Zahl und Affinität der Insulinrezeptoren führt primär zu einer Insulinresistenz, die im weiteren Verlauf in einen Diabetes Mellitus Typ 2 übergeht. Die Insulinkonzentration wurde in unserer Studie sowohl nüchtern als auch postprandial während des oMTT und des oGTT gemessen, jedoch ergaben die Messwerte keine signifikante Veränderung der Insulinkonzentration durch die Mutation. Bei der Bestimmung der postprandialen Glucosekonzentration während des oMTT konnten wir eine tendenziell erhöhte Glucosekonzentration feststellen ( $p=0,07$ ) (Tabelle 3). Da der Unterschied nach dem oGTT nicht zu detektieren war unterstreicht dies die Bedeutung des oMTT.

Zeichen einer Insulinresistenz ist eine gestörte Glucosetoleranz. Eine gestörte Glucosetoleranz konnten wir bei den Trägern des CPT 1b I66V SNP in unserer Studie jedoch nicht feststellen. Dementsprechend ist es durchaus möglich, daß zum Zeitpunkt der Untersuchung noch keine diesbezüglichen pathologischen Veränderungen vorlagen. Daher wäre es interessant eine prospektive Folgeuntersuchung der Probanden durchzuführen. Sollte sich in der Zwischenzeit herausstellen, daß die Gruppe der CPT 1b I66V SNP-Träger eine gestörte Glucosetoleranz oder gar einen Diabetes Mellitus Typ 2 entwickelt hat, ist anzunehmen, daß das Vorliegen des untersuchten SNP zu einer erhöhten Prädisposition bei der Entwicklung eines Diabetes Mellitus Typ 2 oder zumindest einer gestörten Glucosetoleranz führt. Der Einfluß auf den Fettstoffwechsel führt zu höheren Triglyzeridwerten, die dadurch Einfluß auf eine erhöhte Artheroskleroseneigung haben können, damit vergesellschaftet ist ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko. Unter diesem Aspekt wäre es interessant eine Auswirkung auf das kardiovaskuläre Risiko zu untersuchen, dieses erfolgte in unserer Studie jedoch nicht.

In der Literatur ist eine Assoziationsstudie zu diesem SNP zu finden [Robitaille et al. 2007], im Zuge der Studie wurde nach einer Assoziation zwischen verschiedenen SNP von CPT 1b, unter anderem dem SNP I66V und E531K und BMI, Größe, Bauchumfang und Körpergewicht gesucht. Eine Assoziation des CPT 1b I66V-SNP zu diesen Parametern konnten Robitaille et al. 2007 analog zu unseren Ergebnissen nicht feststellen. Stoffwechselparameter wurden in dieser Studie nicht untersucht. Der fehlende Zusammenhang mit dem Übergewicht deutet darauf hin, daß die von uns gefundenen Effekte

vermutlich nicht durch die Beeinflussung durch einen erhöhten Körperfettanteil zu erklären sind.

Der zweite CPT1b-Polymorphismus (CPT1b E531K) hat einen gleichsinnigen Einfluß auf die LDL-Konzentration, diese ist bei dem rezessiv vererbten Polymorphismus gegenüber der Gruppe mit den heterozygoten Trägern und dem Wildtyp signifikant erhöht. Es ist also ein additiver Effekt dieser beiden Polymorphismen denkbar. Ebenso wie bei dem anderen beschriebenen SNP von CPT 1b liegt hier auf molekularer Ebene ein Aminosäuretausch vor, jedoch an Position 531 in der Aminosäuresequenz. Der Austausch ist durch Wechsel der Aminosäure Glutaminsäure beim Wildtyp gegen die Aminosäure Lysin bei den SNP-Trägern charakterisiert. Beide Aminosäuren gehören zur Gruppe der hydrophilen Aminosäuren, jedoch wird die Glutaminsäure zusätzlich in die Untergruppe der sauren hydrophilen Aminosäuren eingeteilt, wohingegen das Lysin zur Untergruppe der basischen hydrophilen Aminosäuren gehört. Diese Unterteilung bedeutet, daß die Glutaminsäure mit ihrer Carboxylgruppe eine negative Ladung aufweist. Das Lysin weist durch das Vorhandensein einer positiv geladenen Aminogruppe eine positive Ladung auf. Auch bei diesem SNP ist die genaue Lage der Position 531 in Bezug auf das aktive Zentrum des Proteins nicht bekannt. In diesem Fall ist es durchaus möglich, daß die Aminosäure der entsprechenden Position zur Affinität des Metabolits zum Enzym beiträgt. Ein Zusammenhang mit der Affinität könnte man darüber herleiten, daß beispielsweise das Acyl-CoA am Kohlenstoff der Thioesterbindung eine positive Partialladung aufweist. Das könnte den Zweck einer negativen Ladung an der Glutaminsäure begründen und die Affinität des Substrates zum Enzym erhöhen. Bei den SNP-Trägern wäre dann die Affinität des Metaboliten durch den Austausch der negativen gegen die positive Ladung herabgesetzt. Eine Herabsetzung der Affinität könnte die Besetzung des aktiven Zentrums und die Metabolisierung verlangsamen. Die Folge wäre eine Erhöhung der cytoplasmatischen Konzentration von freien Fettsäuren. Durch die erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren in den Zellen als auch konsekutiv im Blut wäre dann wie bei dem vorgenannten CPT 1b I66V-SNP eine erhöhte LDL-Konzentration erklärbar [Eckel et al. 2005]. Die erhöhte LDL-Konzentration ließe sich durch eine erhöhte Triglyzeridsynthese in der Leber [Eckel et al. 2005] erklären. Dieser SNP führt zu einer geringfügigen, aber signifikanten Erhöhung der Triglyzeride sowohl nüchtern als auch postprandial. Der Effekt des CPT 1b E531K SNP auf den Fettstoffwechsel ist jedoch im Vergleich zum I66V SNP gering. Auch hier wäre es interessant festzustellen, ob dieser SNP bei den Trägern in der Zwischenzeit zu einer gestörten Glucosetoleranz oder gar einem

Diabetes Mellitus Typ 2 geführt hat. Sollte das der Fall sein, so könnten beide SNP als Marker für eine mögliche Prädisposition eines Diabetes Mellitus Typ 2 dienen. Die Berechnung des linkage disequilibrium ergab eine Häufigkeit eines gemeinsamen Auftretens beider SNP von 0,208 also in etwa bei 21%.

Auch der SNP CPT 1b E531K ist in der Assoziationsstudie von Robitaille et al. 2005 beschrieben worden. In der dbSNP Datenbank ist dieser SNP ebenfalls auffindbar. In der Studie von Robitaille et al. 2005 konnte eine signifikante Assoziation zwischen den sowohl homozygoten als auch den heterozygoten Trägern des CPT 1b E531K Polymorphismus und den Parametern BMI, Gewicht und Taillenumfang in Abhängigkeit vom Fettkonsum der Probanden festgestellt werden. Sie konnten feststellen, daß dieser SNP verschiedene Phänotypen der Fettleibigkeit modulieren kann, vor allem bei denjenigen Probanden, die eine erhöhte Bereitstellung an Lipiden in der Nahrung erfahren haben. Auch vermuten sie, daß eine durch den SNP beeinträchtigte Fettsäureoxidation zu einer Adipositas führen kann. Allerdings wurde in dieser Studie keine Assoziation der CPT 1b SNP und dem metabolischen Syndrom oder LDL-Cholesterin untersucht.

Es existiert bisher lediglich eine Assoziationsstudie von SNP in CPT Genen mit Parametern des metabolischen Syndroms. Die Studie untersuchte das CPT 1a-Gen (Leberisofom). Es konnten in dieser Studie keine signifikanten Assoziationen zwischen den SNP und Diabetes Mellitus Typ 2 sowie den anderen Parametern des metabolischen Syndroms festgestellt werden. In dieser Studie wurden mögliche Effekte von SNP des CPT 1a Genes auf den hepatischen Lipidgehalt, den HOMA-IR-Wert und die Konzentration der Serumtriglyzeride bei 87 Diabetes Typ 2 Probanden untersucht. Diese Studie konnte keinen Zusammenhang zu einer Insulinresistenz oder einem Diabetes Mellitus Typ 2 herstellen [Hirota et al. 2007]. Das CPT 1a-Gen wurde in unserer Studie nicht untersucht.

Der von uns untersuchte CPT 2 SNP wurde zuvor noch nie in Assoziationsstudien untersucht. Wir fanden hier im Gegensatz zu den SNP im CPT 1b-Gen bei den homozygoten Trägern des CPT 2 V368I-Polymorphismus eine signifikant niedrigere Nüchterntriglyzeridkonzentration (Tabelle 3). Auf molekularer Ebene findet auch hier ein Aminosäuretausch statt. Der Austausch liegt an Position 320 in der Aminosäuresequenz des CPT 2. Es kommt dadurch zu einem Austausch von Valin beim Wildtyp zu Isoleucin bei den SNP-Trägern. Wie auch schon beim CPT 1b I66V SNP angemerkt, besitzt Valin durch seine Molekülstruktur ein kleineres Volumen als Isoleucin. Es ist also möglich, daß die Aminosäure Isoleucin zu einem Auseinanderweichen zweier hydrophober Enzymdomänen führt. Im Falle dieser Mutation

müsste es jedoch durch das Auseinanderweichen zu einer Erweiterung des aktiven Zentrums kommen, welche dazu führt, daß die Bindung von Acylcarnitin an das aktive Zentrum schneller erfolgt kann als sonst. Eine schnellere Bindung würde insgesamt zu einer Beschleunigung des Substratumsatzes führen und dementsprechend auch eine Verringerung der Triglyzeridwerte zur Folge haben.

Zusammenfassend kann man aus unseren Ergebnissen schließen, daß die Träger einer der beiden oben beschriebenen CPT 1b SNP ein deutlich erhöhtes Risiko für eine Dyslipidämie aufweisen. Da weiterhin ein SNP (CPT 1b I66V) bereits zu erhöhten postprandialen Glucosekonzentrationen führt, könnte das CPT-Gen ein Kandidatgen für die Entwicklung des Metabolischen Syndroms darstellen. Dementsprechend wäre eine Genotypisierung der SNP im Sinne einer Risikoabschätzung in der Allgemeinbevölkerung zu diskutieren.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen Metabolischen Syndrom und den Genen carnitinabhängiger Transportproteinen CACT, CPT 1 und CPT 2 Genen gibt. Probanden der Metabolic Intervention Cohort Kiel (MICK) wurden auf das Vorhandensein von codierenden SNP der CPT 1 und 2 Gene rs470117 (CPT 1b, 531 E/K), rs3213445 (CPT 1b, 66 I/V) und rs1799821 (CPT 2, 368 V/I) untersucht. Weiterhin wurde von allen Teilnehmern eine Stichprobe von 47 Probanden ausgewählt und das CACT-Gen sequenziert um Polymorphismen in diesem Gen zu detektieren, da für dieses Gen lediglich 3 seltene Polymorphismen in der von uns verwendeten Datenbank (National Center of Biotechnology Information) zu finden waren. Mit Hilfe der TaqMan-Methode wurde die Probanden DNA auf die codierenden CPT Polymorphismen untersucht.

Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang des CPT 1b E531K Polymorphismus mit einer erhöhten LDL-Konzentration und für den CPT 1b I66V SNP ein signifikanter Zusammenhang mit erhöhten Nüchterntriglyzeriden und erhöhten postprandialen Triglyzeriden. Zusätzlich wiesen die Träger des seltenen Allels tendenziell erhöhte postprandiale Glucosekonzentrationen auf. Die Sequenzierung erbrachte keine Polymorphismen im CACT Gen. Sämtliche beschriebenen Fälle von genetischer Varianz in diesem Gen bestätigen zudem eine konservative Vererbung des CACT Gens.

Eine mögliche Verbindung zwischen dem metabolischen Syndrom und den carnitinabhängigen Transportproteinen kann vor allem über Mutationen des CPT 1b Gens hergestellt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. al Aqeel, A. I., Rashed, M. S., Wanders, R. J. (1999): Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency is a treatable disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22(3): 271-5
2. Boden, G. (1998): Free Fatty Acids (FFA), A link between obesity and insulin resistance. *Frontiers in Bioscience* 3, 169-175
3. Brivet, M., Slama, A., Millington, D. S., Roe, C. R., Demaugre, F., Legrand, A., Boutron, A., Poggi, F., Saudubray, J. M. (1996): Retrospective diagnosis of carnitine-acylcarnitine translocase deficiency by acylcarnitine analysis in the proband guthrie card and enzymatic studies in the parents. *J. Inherit. Metab. Dis.* 19(2): 181-4
4. Brivet, M., Boutron, A., Slama, A., Costa, C., Thuillier, L., Demaugre, F., Rabier, D., Saudubray, J.M. and Bonnefont, J.P. (1999): Defects in activation and transport of fatty acids. *J. Inher. Metab. Dis.* 22: 428-441
5. Chalmers, R.A., Stanley, C. A., English, N., Wigglesworth, J. S. (1997): Mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase deficiency presenting as sudden neonatal death. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22(6): 733-9
6. Choong, K., Clarke, J. T., Cutz, E., Pollit, R. J., Olpin, S. E. (2001): Lethal cardiac tachyarrhythmia in a patient with neonatal carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *Pediatr. Dev. Pathol.* 4(6): 573-9
7. Costa, C., Costa, J. M., Nuoffer, J. M., Slama, A., Boutron, A., Saudubray, J. M., Legrand, A., Brivet, M. (1999): Identification of the molecular defect in a severe case of carnitine-acylcarnitine carrier deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22(3): 267-70
8. Eckel, R., Grundy, S., Zimmet, P. (2005): The metabolic syndrome. *The Lancet*, Volume 365, Issue 9468, Pages 1415-1428
9. Galron, D., Birk, O. S., Kazanovitz, A., Moses, S. W., HersHKovitz, E. (2004): Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: identification of a novel molecular defect in a bedouin patient. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27(2): 267-73
10. Haitina, T., Lindblom, J., Renström, T., Fredriksson, R. (2006): Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC 25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics*;88(6):779-90
11. Hirota, Y., Ohara, T., Zenibayashi, M., Kuno, S., Fukuyama, K., Teranishi, T., Kouyama, K., Miyake, K., Maeda, E., Kasuga, M. (2007): Lack of association of



- CPT1A polymorphisms or haplotypes on hepatic lipid content or insulin resistance in Japanese individuals with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 56(5):656-61
12. Huizing, M., Iacobazzi, V., IJlst, L., Savelkoul, P., Ruitenbeek, W., van den Heuvel, L., Indiveri, C., Smeitink, J., Trijbels, F., Wanders, R., Palmieri, F. (1997): Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA and identification of the molecular defect in a patient. *Am. J. Hum. Genet.* 61:1239-1245
  13. Huizing, M., Wendel, U., Ruitenbeek, W., Iacobazzi, V., IJlst, L., Veenhuizen, P., Savelkoul, P., van den Heuvel, L. P., Smeitink, J. A., Wanders, R. J., Trijbels, J. M., Palmieri, F. (1998): Carnitine-acylcarnitine carrier deficiency: identification of the molecular defect in a patient. *J. Inherit. Metab. Dis.* 21(3): 262-7
  14. Iacobazzi, V., Naglieri, M. A., Stanley, C. A., Wanders, R. J., Palmieri, F. (1998): The structure and organization of the human carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252(3): 770-4
  15. Iacobazzi, V., Invernizzi, F., Baratta, S., Pons, R., Chung, W., Garavaglia, B., Dionisi-Vici, C., Ribes, A., Parini, R., Huertas, M. D., Roldan, S., Lauria, G., Palmieri, F., Taroni, F. (2004): Molecular and functional analysis of SLC25A20 mutations causing carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *Hum. Mutat.* 24(4): 312-20
  16. IJlst, L., van Roermund, C. W. T., Iacobazzi, V., Oostheim, W., Ruiter, J. P. N., Williams, J. C., Palmieri, F. and Wanders, R. J. A. (2001): Functional analysis of mutant human carnitine acylcarnitine translocases in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280(3): 700-6
  17. Lopriore, E., Gemke, R. J., Verhoeven, N. M., Jakobs, C., Wanders, R. J., Roeleveld-Versteeg, A. B., Poll-The, B. T. (2001): Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: phenotype, residual enzyme activity and outcome. *Eur. J. Pediatr.* 160(2): 101-4
  18. Löffler, Petrides (1998): *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, Berlin
  19. Niezen-Koning, K. E., van Spronsen, F. J., IJlst, L., Wanders, R. J., Brivet, M., Duran, M., Reijngoud, D. J., Heymans, H. S., Smit, G. P. (1995): A patient with lethal cardiomyopathy and a carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 18(2): 230-2
  20. Nuoffer, J. M., de Lonlay, P., Costa, C., Roe, C. R., Chamoles, N., Brivet, M., Saudubray, J. M. (2000): Familial neonatal SIDS revealing carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 159(1-2): 82-5

21. Ogawa, A., Yamamoto, S., Kanazawa, M., Takayanagi, M., Hasegawa, S., Kohno, Y. (2000): Identification of two novel mutations of the carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) gene in a patient with CACT deficiency. *J. Hum. Genet.* 45(1): 52-5
22. Ogier de Baulny, H., Slama, A., Touati, G., Turnbull, D. M., Pourfarzam, M., Brivet, M. (1995): Neonatal hyperammonemia caused by a defect of carnitine-acylcarnitine translocase. *J. Pediatr.* 127(5): 723-8
23. Olpin, S. E., Bonham, J. R., Downing, M., Manning, N. J., Pollitt, R. J., Sharrard, M. J., Tanner, M. S. (1997): Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency--a mild phenotype. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20(5): 714-5
24. Palmieri, F. (2004): The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*;447(5): 689-709
25. Pande, S. V., Brivet, M., Slama, A., Demaugre, F., Aufrant, C., Saudubray, J. M. (1993): Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency with severe hypoglycemia and auriculo ventricular block. translocase assay in permeabilized fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 91(3): 1247-52
26. Parini, R., Invernizzi, F., Menni, F., Garavaglia, B., Melotti, D., Rimoldi, M., Salera, S., Tosetto, C., Taroni, F. (1999): Medium-chain triglyceride loading test in carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: insights on treatment. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22(6): 733-9
27. Peluso, G., Petillo, O., Margarucci, S., Grippo, P., Melone, M. A., Tucillo, F., Calvani, M. (2005): Differential carnitine/acylcarnitine translocase expression defines distinct metabolic signatures in skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 203(2): 439-46
28. Reaven, G. M. (1995): Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiological Reviews* 75(3): 473-86
29. Ricardi, G., Giacco, R., Rivellesse, A. A. (2004): Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin. Nutr.* 23(4):447-56
30. Robitaille, J., Houde, A., Lemieux, S., Pérusse, L., Gaudet, D., Vohl, M.-C. (2007) : Variants within the muscle and liver isoforms of the carnitine palmitoyltransferase I (CPT1) gene interact with the fat intake to modulate indices of obesity in French-Canadians. *J. Mol. Med.* 85:129-137
31. Rubio-Gozalbo, M. E., Vos, P., Forget, P. P., Van Der Meer, S. B., Wanders, R. J., Waterham, H. R., Bakker, J. A. (2003) : Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: case report and review of the literature. *Acta. Paediatr.* 92(4): 501-4

32. Rubio-Gozalbo, M. E., Bakker, J. A., Waterham, H. R., Wanders, R. J. (2004): Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects. *Mol. Aspects. Med.* 25(5-6): 521-32
33. Röschinger, W., Muntau, A. C., Duran, M., Dorland, L., IJlst, L., Wanders, R. J., Roscher, A. A. (2000): Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: metabolic consequences of an impaired mitochondrial carnitine cycle. *Clin. Chim. Acta.* 298(1-2): 55-68
34. Stanley, C. A., Hale, D. E., Berry, G. T., Deleeuw, S., Boxer, J., Bonnefont, J. P. (1992): Brief report: a deficiency of carnitine-acylcarnitine translocase in the inner mitochondrial membrane. *N. Engl. J. Med.* 327(1): 19-23
35. Wasant, P., Matsumoto, I., Naylor, E., Liammongkolkul, S. (2002): Mitochondrial fatty acid oxidation disorders in Thai infants: a report of 3 cases. *J. Med. Assoc. Thai.* 85 Suppl 2: S710-9 (Abstract)
36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>
37. Yang, B. Z., Mallory, J. M., Roe, D. S., Brivet, M., Strobel, G. D., Jones, K. M., Ding, J. H., Roe, C. R. (2001): Carnitine/acylcarnitine translocase deficiency (neonatal phenotype): successful prenatal and postmortem diagnosis associated with a novel mutation in a single family. *Mol. Genet. Metab.* 73(1): 64-70

## 7 Anhang

### 7.1 Tabellen

**Tabelle 1** Primerinformation und Vergleich von Literaturangaben [Iacobazzi et al. 1998] und Primermodifikation, sowie Schmelztemperaturen und entsprechende Fragmentlängen

Exonnummer	Richtung des Primers	Literaturangabe 5' → 3'	Verwendete Primersequenz 5' → 3'	Schmelztemperatur	Fragmentlänge in Bp
Exon 1	vorwärts Primer	GGT-CGA-GAA-CTG-ACA-GAC-GGA-G	GCC-CGA-GAA-CTG-ACA-GAC-GGA-G	72°C	248
	rückwärts Primer	ACA-CAT-GCC-CTC-TTC-TGC-CCA-G	ACA-CAT-GCC-CCT-CTT-CTG-CCC-AG		
Exon 2	vorwärts Primer	AAC-CCC-GTG-AAT-GTG-TTC-TG	CAG-GCA-GTT-CTG-ATT-CTG-GT	60°C	196
	rückwärts Primer		CAA-CCC-CGT-GAA-TGT-GTT-CT		
Exon 3	vorwärts Primer	GTC-ACG-CTA-CCA-GGC-ACA-AC	AAA-GGT-GGT-GGT-GTC-TGT-AAA-C	60°C	227
	rückwärts Primer		GTC-ACG-CTA-CCA-GGC-AGA-AC		
Exon 4	vorwärts Primer	CTC-GGT-GGT-TAA-GTC-ACA-GGT-G	CTC-GGT-GGT-TAG-TCA-CAG-GTG	66°C	250
	rückwärts Primer		GCC-ACT-GCA-CCC-AGT-CCT-GA		
Exon 5	vorwärts Primer	CCA-CTT-CAG-GTG-ACC-TTC-CCC-A	CCT-GCT-GGG-TCT-GTG-ACT-CTG-A	66°C	267
	rückwärts Primer		GGC-TAA-TCT-GGC-AAT-CCA-GGC-A		
Exon 6	vorwärts Primer	CAG-ACA-TGG-AGC-CAA-GAA-CA	TGG-CGA-AGA-GTT-TAT-GTA-CTT-T	56°C	207
	rückwärts Primer		CTA-CTT-CTG-CTT-TCA-GAT-TCA-C		
Exon 7	vorwärts Primer		GCC-ACT-CTC-ACA-GCC-TTT-GTC-TA	66°C	237
	rückwärts Primer		TAT-GAG-CTT-TGC-ACC-CCA-GGA-TTA		
Exon 8	vorwärts Primer	GAC-TTA-ACT-CGT-AGT-TTC-TCC-T	GAC-TTA-ACT-GCT-AGT-TTC-TCC-T	60°C	258
	rückwärts Primer		GGA-ACA-AGC-AAA-AGT-CAA-ACC-A		
Exon 9	vorwärts Primer	GTA-GTA-TCT-GGT-CTG-GAA-GCT-ACT	CAG-GGC-CAG-CAA-AGC-ATA-GTG	58°C	420
	rückwärts Primer		5' GTA-GTA-TCT-GGT-CTG-GAA-GCT-AC		

**Tabelle 2** Ausgewählte Polymorphismen der Carnitin-Palmitoyl-Transferase Ib und II (*CPT1b/2*) lokalisiert auf den Chromosomen 22 und 11

Gene (alias)	dbSNP ID	Position des SNP	Sequenz (5'→3') <sup>a</sup>	AS Wechsel	Allel-frequenz
CPT1b (muscle)	rs 470117	Exon 13	aggcggatcatcA/Gagagttctac	531 E/K	0.27
CPT1b	rs 2269383	Exon 8	tcggatcccggA/Gcaaggacacag	320G/D	0.009
CPT1b	rs 3213445	Exon 2	ggctggtcgtcA/Gtcatggcaacac	66I/V	0.10
CPT2	rs 1799821	Exon 4	gctctactgccA/Gtccactttgag	368V/I	0.66

**Tabelle 3** Anthropometrische und Metabolische Parameter der CPT1b 66I/V, CPT1b 531 E/K und CPT2 368V/I Genotypen

<sup>a</sup> arithmetisches Mittel (SEM); <sup>b</sup> geometrisches Mittel (+/- SEM); <sup>c</sup> t-Test zum Vergleich der Mittelwerte, zweiteilige Signifikanz; <sup>d</sup> t-Test zum Vergleich der Mittelwerte, berechnet mit logarithmisch umgerechneten Daten, zweiteilige Signifikanz; <sup>e</sup> HOMA homeostasis model assesment: mU/l Insulin x mmol/l Glucose x 22.5<sup>-1</sup>; <sup>f</sup> Mittelwert zweier unabhängiger Messungen

Variable	CPT1b 66I/V			CPT1b 531 E/K			CPT2 368V/I		
	II	VV+IV	p	EE+EK	KK	p	VV+VI	II	p
Probanden [n]	629	71		505	190		580	120	
Alter [Jahre] <sup>a</sup>	58,9 (0.02)	59,8 (0.005)	0.19 <sup>d</sup>	59 (0.002)	59,15 (0.003)	0.64 <sup>d</sup>	58.9 (0.02)	59.5 (0.004)	0.22 <sup>d</sup>
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] <sup>a</sup>	27.42 (0.17)	27.43 (0.42)	0.97 <sup>c</sup>	27.41 (0.18)	27.43 (0.29)	0.94 <sup>c</sup>	27.48 (0.17)	27.0 (0.33)	0.20 <sup>c</sup>
WHR <sup>a</sup>	0.99 (0.003)	0.99 (0.006)	0.40 <sup>c</sup>	0.99 (0.003)	0.99 (0.004)	0.96 <sup>c</sup>	0.99 (0.003)	0.98 (0.005)	0.20 <sup>c</sup>
Taillenumfang [cm] <sup>a</sup>	100.11 (0.50)	100.3 (1.14)	0.88 <sup>c</sup>	99.92 (0.56)	100.53 (0.81)	0.53 <sup>c</sup>	100.34 (0.52)	98.77 (0.98)	0.16 <sup>c</sup>
systolischer Blutdruck [mmHg] <sup>a</sup>	129.04 (0.72)	133.03 (2.22)	0.09 <sup>c</sup>	129.22 (0.82)	129.86 (1.24)	0.67 <sup>c</sup>	129.58 (0.75)	128.55 (1.59)	0.56 <sup>c</sup>
diastolischer Blutdruck [mmHg] <sup>a</sup>	80.49 (0.43)	80.42 (1.40)	0.96 <sup>c</sup>	80.46 (0.49)	80.53 (0.75)	0.94 <sup>c</sup>	80.54 (0.44)	79.98 (1.02)	0.61 <sup>c</sup>
HDL [mmol/l] <sup>a</sup>	53.49 (0.59)	52.5 (1.76)	0.59 <sup>c</sup>	53.5 (0.65)	53.36 (1.07)	0.91 <sup>c</sup>	53.31 (0.62)	53.93 (1.19)	0.65 <sup>c</sup>
LDL [mmol/l] <sup>a</sup>	142.99 (1.33)	151.74 (3.29)	<b>0.02<sup>c</sup></b>	142.1 (1.47)	148.78 (2.33)	<b>0.02<sup>c</sup></b>	144.15 (1.33)	142.73 (3.32)	0.69 <sup>c</sup>
HOMA <sup>e,f</sup> [mU*mmol*l <sup>-2</sup> ] <sup>b</sup>	3.90 (0.01)	4.02 (0.03)	0.15 <sup>d</sup>	3.96 (0.01))	3.71 (0.02)	0.94 <sup>d</sup>	3.93 (0.01)	3.64 (0.02)	0.24 <sup>d</sup>
Nüchtern Triglyzeride [mmol/l] <sup>b</sup>	137.02 (0.008)	170.56 (0.03)	<b>0.02<sup>c</sup></b>	136.13 (0.009)	151.63 (0.02)	0.12 <sup>c</sup>	143.81 (0.009)	124.38 (0.02)	<b>0.03<sup>c</sup></b>
Pp Triglyzeride (AUC)	1688.44 (0.08)	2037.42 (0.02)	<b>0.008<sup>d</sup></b>	1675.36 (0.009)	1838.57 (0.02)	0.18 <sup>d</sup>	1746.25 (0.008)	1611.00 (0.01)	0.21 <sup>d</sup>
Nüchtern Insulin [μIE/ml]	14.72 (0.48)	15.59 (1.52)	0.57	14.42 (0.46)	15.33 (1.09)	0.36	14.77 (0.49)	14.11 (1.00)	0.57
Pp Insulin oMTT (AUC)	202.51 (6.83)	223.09 (19.45)	0.34	201.16 (7.39)	211.60 (13.27)	0.47	206.14 (7.27)	192.09 (13.34)	0.41
Pp Insulin oGTT (AUC)	174.24 (5.61)	176.12 (12.28)	0.91	169.84 (5.63)	184.33 (11.71)	0.21	177.46 (5.84)	155.03 (10.62)	0.10
Nüchtern Glucose <sup>f</sup> [mmol/l] <sup>b</sup>	104,38 (0.66)	108.42 (2.48)	0.12 <sup>c</sup>	104.82 (0.78)	104.44 (1.07)	0.78 <sup>c</sup>	104.82 (0.73)	103.96 (1.12)	0.52 <sup>c</sup>
Pp Glucose oMTT (AUC)	519.22 (0.003)	550.78 (0.01)	0.07 <sup>d</sup>	524.90 (0.003)	515.97 (0.006)	0.26 <sup>d</sup>	524.59 (0.003)	512.00 (0.005)	0.2 <sup>d</sup>
Pp Glucose oGTT (AUC)	463.78 (0.004)	490.51 (0.01)	0.12 <sup>d</sup>	466.56 (0.004)	466.41 (0.003)	0.90 <sup>d</sup>	468.30 (0.004)	454.63 (0.008)	0.18 <sup>d</sup>

**Tabelle 4** Ergebnisse Chi-Quadrat-Test: Ordinalparameter gestörte Glucosetoleranz ja/nein, metabolisches Syndrom ja/nein, Hypertonie ja/nein und Hypertriglyzeridämie ja/nein für CPT1b 66IV, CPT1b 531EK und CPT2 368VI

Genotyp	gestörte Glucosetoleranz		OR (95% CI)	p <sup>c</sup>	metabolisches Syndrom ja/nein		OR (95%)	p <sup>c</sup>
	ja n (%)	nein n (%)			ja n (%)	nein n (%)		
<i>CPT 1b 66IV II</i>	143 (88)	481 (91)	1	0,180	137 (87)	484 (9)	1	0,140
<i>CPT 1b 66IV IV+VV</i>	20 (12)	50 (9)	1,345 (0,78-2,34)		20 (13)	50 (91)	1,413 (0,81-2,46)	
<i>CPT 1b 531EK EK+EE</i>	115 (70)	388 (74)	1	0,29	112 (71)	388 (73)	1	0,292
<i>CPT 1b 531EK KK</i>	47 (30)	139 (26)	1,141 (0,77-1,69)		46 (29)	140 (27)	1,138 (0,77-1,69)	
<i>CPT 2 368VI IV+VV</i>	133 (82)	443 (83)	1	0,405	135 (85)	438 (82)	1	0,202
<i>CPT 2 368VI II</i>	29 (18)	89 (17)	1,085 (0,68-1,72)		23 (15)	95 (18)	0,785 (0,48-1,29)	

Genotyp	Hypertonie ja/nein		OR (95% CI)	p <sup>c</sup>	Hypertriglyzeridämie ja/nein		OR (95%)	p <sup>c</sup>
	ja n (%)	nein n (%)			ja n (%)	nein n (%)		
<i>CPT 1b 66IV II</i>	324 (89)	308 (91)	1	0,181	186 (85)	436 (92)	1	<b>0,002</b>
<i>CPT 1b 66IV IV+VV</i>	41 (11)	30 (9)	1,299 (0,79-2,13)		34 (15)	36 (8)	2,214 (1,34-3,65)	
<i>CPT 1b 531EK EK+EE</i>	256 (71)	252 (75)	1	0,12	156 (72)	345 (74)	1	0,32
<i>CPT 1b 531EK KK</i>	106 (29)	84 (25)	1,242 (0,89-1,74)		62 (28)	124 (26)	1,106 (0,77-1,58)	
<i>CPT 2 368VI IV+VV</i>	299 (82)	284 (83)	1	0,32	190 (86)	384 (82)	1	0,09
<i>CPT 2 368VI II</i>	65 (18)	55 (17)	1,123 (0,76-1,67)		31 (14)	87 (18)	0,720 (0,46-1,12)	

## 7.2 Danksagung

Prof. Dr. med. Jürgen Schrezenmeir, Direktor des Instituts für Physiologie und Biochemie der Ernährung des Max Rubner-Institut Kiel, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes.

Dr. Ulf Helwig danke ich in besonderem Maße für die anfängliche Betreuung und das immer offene Ohr.

Ich danke auch Frau Dr. med Diana Rubin.

Danken möchte ich auch Frau Yvonne Dignal und Daniela Stengel aus dem Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung für Ihre fachliche Unterstützung bei der Umsetzung des experimentellen Teils.

Für die Moralische Unterstützung, den wertvollen Rat bei der Abfassung der Arbeit und die Hilfe beim Korrekturlesen danke ich meiner Ehefrau Kerstin.

## 7.2 Lebenslauf

Name: Sabandal,  
 Vornamen: Martin Mariano Isabelo  
 Geburtsdatum, -ort: 10. September 1976 in Bonn  
 Anschrift: Maximilianstr. 35  
 48147 Münster  
 Familienstand: verheiratet

### Schulbesuch

1983 - 1987	Grund- und Hauptschule Mittelschwansen
1987 - 1989	Jungmannschule in Eckernförde
1989 - 1993	Gudewerdt-Realschule in Eckernförde - Abschluss mit Mittlerer Reife -
1993 - 1997	Jungmannschule in Eckernförde - Abschluss mit Abitur -

### Zivildienst

1997 - 1998	Ostseeklinik Damp – Abt. OP
-------------	-----------------------------

### Praktika

1998 bis Studienbeginn	Firma Stryker Howmedica – Abt. Traumatologie
------------------------	---

### Hochschulstudium

04/1999	Beginn des Studiums der Zahnmedizin
03/2000	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
03/2002	Zahnärztliche Vorprüfung
seit 02/2003	Beginn Promotionsarbeit
12/2005	Zahnärztliche Prüfung
08.12.2005	Zahnärztliche Approbation
seit 04/06	wissenschaftlicher Mitarbeiter der Poliklinik für Zahnerhaltung der Uniklinik Münster